



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

NATHALIE OMMUNDSEN PESSOA

RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) E PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*)

FORTALEZA

2014

NATHALIE OMMUNDSEN PESSOA

RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE TAMBACUI (*Colossoma
macropomum*) E PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução de peixes.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Souza Sampaio

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho

Bibliotecário (a) Leila Cavalcante Sátiro – CRB-3 / 544

P475r Pessoa, Nathalie Ommundsen.

Resfriamento de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). / Nathalie Ommundsen Pessoa.— 2014.

CD-ROM 106f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof^a.Dr^a.Célia Maria de Souza Sampaio.

Co-orientação: Prof. Dr. Aldeney Andrade Soares Filho.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

1. Aquicultura. 2. Peixes de água doce. 3. Fases ontogenéticas.

I. Título.

CDD: 636.089

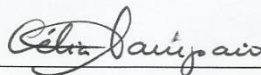
NATHALIE OMMUNDSEN PESSOA

RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES DE TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*) E PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*)

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da Universidade
Estadual do Ceará, como
requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor
em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 10 / 01 / 2014

BANCA EXAMINADORA



Dr^a. Célia Maria de Souza Sampaio

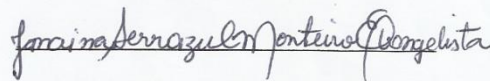
Orientadora



Dr Aldeney Andrade Soares Filho

Universidade Federal do Ceará

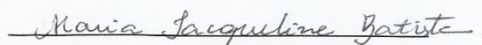
Co-orientador



Dr^a. Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

Universidade Estadual do Ceará

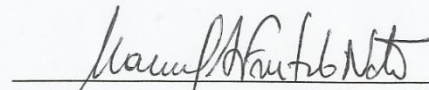
Examinador



Dr^a. Maria Jacqueline Batista

Universidade Federal do Ceará

Examinador



Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto

Universidade Federal do Ceará

Examinador

“Há algo invulnerável em mim, qualquer coisa que se não pode enterrar e que faz saltar os rochedos; **chama-se a minha vontade.**”
F.W.Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer antes de tudo, minha mãe, Lena Ommundsen Alard, que sempre me deu forças quando eu não tinha, me levantou quando caí (e foram muitas vezes), pela sua força de caráter e inteligência, uma mulher que admiro demais e sem ela, esse trabalho não teria sido possível.

À minha orientadora Célia Maria de Souza Sampaio, que, de co-orientadora passou a orientadora e me recebeu sem hesitar. Tenho muito orgulho de ter conquistado a confiança de uma mulher justa, exigente e admirável.

Ao meu co-orientador Aldeney Andrade Soares Filho, mais que co-orientador, um amigo de longa data cuja história de vida é um exemplo e de competência profissional fantástica.

À Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista, professora, pesquisadora e acima de tudo uma amiga querida, agradeço pelo apoio e todos os bons conselhos.

À Maria Jacqueline Batista, por ter aceitado participar da banca sem hesitar e pelas valiosas sugestões.

À Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto, grande professor e profissional, por aceitar prontamente o convite de participar da banca.

À Francisco Gerson Mendes de Souza Filho, meu amor, pela estatística, cumplicidade, apoio, lealdade e principalmente paciência. Alguém que me fez mudar o jeito de ver o mundo e as pessoas pelo seu bom caráter e coração.

À Ana Tereza Mendonça Viveiros Leal, pesquisadora da Universidade Federal de Lavras - UFLA, pelo imenso apoio, pelas ideias e ajuda valiosa principalmente na elaboração e correção dos artigos, não há palavras que expresse minha gratidão por tudo.

Agradeço especialmente ao pesquisador Claude Langrand e sua esposa Françoise Langrand, pelo apoio na fase final do artigo.

À Míriam Luzia Nogueira Martins de Sousa, pela amizade, por não deixar nada faltar no laboratório e também Manoel Paiva de Araújo Neto, Luana Rolim Melo, Caroline Costa Lucas, Arthur Vinícius Lourenço Ferreira e todos meus colegas do LACAR.

À Eliano Vieira Pessoa, diretor do IFCE- Sobral, cujo exemplo também me inspirou em muitos momentos da vida, primo e acima de tudo, amigo.

Minhas velhas amigas Raquel Sampaio de oliveira (Yara), Ita, Chris, Luciana Uchôa, Vinícius Melo, Juliana Freitas, Rosemary Asfora. São muitos anos de muito afeto e amizade sincera, vocês são muito especiais.

Meus jovens velhos amigos Sarah Ramos, cuja amizade foi à primeira vista e Hemerson Thiago (HT).

Ariane Flávia do Nascimento, a responsável pelo "clique" sobre os embriões, pela amizade e por tantas paixões em comum.

As veterinárias Nina (Glacyanne Moraes) e Dayany Lima, as nossas conversas intermináveis sobre tudo nos famosos chás.

Aos funcionários do DNOCS, especialmente José Agenor Aragão, Socorro Mesquita e Pedro Eymar, por sempre me receberem muito bem, pelo apoio com os animais e disponibilidade da estrutura do Centro de Aquicultura.

Aos meus queridos colegas da Estatística, Caroline Mendes, Jucelino Matos (Justin), Sofia Vasconcelos e Roberto Kleiber.

Não podia deixar de agradecer a um professor que admiro e que me inspirou ao longo do doutorado: Franciscso César Teixeira, professor de Probabilidade, exemplo de professor dedicado e ético, meu espelho profissional e espero um dia chegar perto de sua excelência.

À Virgínia Palácio Fontenele, um agradecimento especial pelo carinho, disposição e cuidados na revisão do inglês dos textos.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, especialmente aos professores Marcos Fábio Gadelha Rocha e Dárcio Ítalo Alves Teixeira e aos funcionários da coordenação, Adriana Maria Sales Albuquerque e Frederico Rocha Cavalcanti.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, pela bolsa de estudos.

E minha homenagem a todos os professores que tive o prazer de ter ao longo da vida desde meu ingresso ao mundo escolar.

RESUMO

A técnica de criopreservação de embriões de peixes encontra-se ainda em estágios iniciais, enquanto que o resfriamento de embriões vem sendo utilizado há algum tempo, com obtenção de bons resultados. O objetivo desse trabalho foi realizar o resfriamento de embriões de pirapitinga, *Piaractus brachypomus* e de tambaqui, *Colossoma macropomum*, submetidos à temperatura de 2 °C, em diferentes tempos de armazenamento. Foram utilizados embriões compostos pelos seguintes estádios embrionários: blastoderme - 1,2-horas pós-fertilização (hpf), epibolia - 5-hpf; fechamento do blastóporo - 8-hpf; aparecimento da vesícula óptica no embrião - 13-hpf. De cada fase ontogenética foram selecionados cem embriões dos grupos e foram resfriados a 2 °C por 6, 8, 10 e 12 horas e em embriões resfriados de *P. brachypomus* a -10 °C em tempos de 6 e 10 horas. Os resultados foram submetidos à Análise de Variância - ANOVA e ao teste de Tukey com significância de 5%. Foi observada uma diferença significativamente superior na média de larvas vivas com desenvolvimento completo em solução crioprotetora de glicose 0.5M e metanol 10% e uma maior sobrevivência nos embriões em estádios de desenvolvimento mais adiantados (8-hpf e 13-hpf). Portanto, se concluir que os estádios embrionários de fechamento de blastóporo (8-hpf) e de aparecimento de vesícula óptica (13-hpf) podem ser considerados os mais recomendados para a utilização em protocolo de resfriamento de embriões, tanto em *P. brachypomus* como em *C. macropomum*, em solução de glicose 0.5M e metanol 10%, mantidos até 8 horas a 2 °C, sendo que o melhor resultado foi na utilização do estádio de 13-hpf estocado por 6 horas. Foi também verificado que embriões de *P. brachypomus* nos estádios de 8-hpf ou 13-hpf foram os melhores indicados para protocolos de resfriamento e podem ser mantidos com melhores resultados em solução de sacarose 17,5% com metanol 10% estocados por 6 horas em -10 °C. Esse estudo em *P. brachypomus* foi o primeiro caso de resfriamento de embriões dessa espécie.

Palavras chave: Aquicultura. Peixes de água doce. Fases ontogenéticas.

ABSTRACT

The technique of cryopreservation of fishes embryos is in early stages of development, although the cooling of embryos is already being used and getting good results. The objective of this work were to conduct cooling embryos of *Piaractus brachypomus* and *Colossoma macropomum*, undergoing temperature of 2 °C, in different storage time. The embryos used consist of the following embryonic stages: blastoderm - 1.2 hours post-fertilization (hpf), epibolia - 5-hpf; closing blastopore - 8-hpf; appearance of the optic vesicle in the embryo - 13-hpf. In each stage of ontogeny a hundred embryos were selected from each group and cooled to 2 °C for 6, 8, 10 and 12 hours and cooled embryos of *P.brachypomus* at -10 ° C in intervals of 6 to 10 hours. The results were submitted to ANOVA and Tukey's test with a significance level of 5%. A significant difference was observed higher than the average live larvae with complete development of glucose in 0.5M cryoprotectant solution and 10% methanol and greater embryo survival in earlier developmental stages (8 hpf and 13-hpf). It was concluded, therefore, that the embryonic stages of closing blastopore (8-hpf) and the appearance of the optic vesicle (13 hpf) can be considered the most recommended for use in cooling protocol embryos, both in *P.brachypomus* and *C. macropomum* in 0.5M glucose solution and 10% methanol, maintained for 8 hours at 2 °C, and the best result was in the use of the stadium 13-hpf stored for six hours. It was also verified *P. brachypomus* embryos at the blastopore-closure (8-hpf) or appearance-of-optic-vesicle (13-hpf) stages are best for use with chilling protocols and that they can be maintained with better results in a 17.5% sucrose-10% methanol solution for up to 6 hours at -10°C. The best results of live larvae were obtained storing 13-hpf embryos for 6 hours. This study in *P. brachypomus* is the first case of cooling embryos of this species.

Keywords: Aquaculture. Fresh water fish. Ontogenetic stage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar adulto de *Colossoma macropomum*..... 16

Figura 2. Exemplar adulto macho de *Piaractus brachypomus* 18

CAPÍTULO 2

Figura 1. Fluxograma do resfriamento de embriões de *C. macropomum* nos quatro estádios embrionários em quatro tempos de estocagem. Adaptado de Lopes et al. (2011).....45

Figura 2. Média de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) de *C. macropomum* tratados e resfriados por diferentes tempo de estocagem. Letras maiúsculas representam diferenças entre crioprotetores para os mesmos tempos de estocagem e letras minúsculas representam diferenças entre os tempos de estocagem para o mesmo tratamento. ANOVA e teste de Tukey.....48

Figura 3. Média de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) para os embriões de *C. macropomum*, tratados com glicose-metanol, glicose-metilglicol e glicose-DMSO, nas diferentes fases ontogenéticas. Letras maiúsculas representam diferenças entre crioprotetores nas mesmas fases ontogenéticas e letras minúsculas

representam diferenças entre fases ontogenéticas no mesmo tratamento. ANOVA e teste de Tukey.....49

Figura 4. Médias de larvas de *P. brachypomus* de embriões em diferentes estádios ontogenéticos e resfriados em glicose combinada com metanol, metilglicol ou DMSO por 6 a 12 horas. A) Blastoderme (~1,2h pós fertilização). B) Epibolia (~5 h pós fertilização). C) Fechamento do blastóporo (~8h pós fertilização). D) Aparecimento da vesícula óptica (~13h pós fertilização).....50

CAPÍTULO 3

Figure 1. A flowchart showing the *P. brachypomum* embryo-chilling procedure for four embryonic stages and four storage times. Adapted from Lopes *et al.* (2011).....64

Figure 2. The percentage of live and normal *P. brachypomus* larvae originated from embryos at different ontogenic stages (from 1.2 to 13 hours post-fertilization) and chilled in glucose combined with methanol, methylglycol or DMSO for 6 to 12 hours (pooled data). Uppercase letters represent differences between cryoprotectants for the same stage and lowercase letters represent differences between stages within the same cryoprotectant. ANOVA and Tukey's test.....66

Figure 3. The percentage of live and normal *P. brachypomus* larvae originated from embryos at different ontogenic stages (pooled data) and chilled in glucose combined with methanol, methylglycol or DMSO for 6 to 12 hours post-fertilization (hpf). Uppercase letters represent differences between cryoprotectants for the same period of chilling and lowercase letters

represent differences between periods of chilling within the same cryoprotectant. ANOVA and Tukey's test.....67

Figure 4. The mean of live and normal *P. brachypomus* larvae originated from embryos at different ontogenic stages and chilled in glucose combined with methanol, methylglycol or DMSO for 6 to 12 hours. A) Blastoderm stage (~1,2h post fertilization). B) Epiboly stage (~5 h post fertilization). C) Blastopore closure stage (~8h post fertilization). D) The appearance-of-optic-vesicle stage (~13h post fertilization).....69

CAPÍTULO 4

Figure 1. A flowchart showing the *P. brachypomum* embryo-chilling procedure for four embryonic stages and four storage times. Adapted from Lopes *et al.* (2011).....83

Figure 2. The mean numbers of live *P. brachypomus* larvae (showing complete embryonic development) following embryonic treatment with different cryoprotectant solutions and chilling for two storage times. Uppercase letters represent differences between treatments for the same hours and lowercase letters represent differences within the treatment.....85

Figure 3. The mean numbers of live *P. brachypomus* larvae (showing complete embryonic development) developing from embryos treated with sucrose-methanol, glucose-methanol or water-methanol solutions at various ontogenetic stages. Uppercase letters represent

differences between treatments for the same stages and lowercase letters represent differences within the treatment.....86

Figure 4. The mean numbers of live *P. brachypomus* larvae (showing complete embryonic developed) developing from embryos treated with cryoprotectant solutions at various ontogenetic stages for various chilling times (6 or 10 hours)87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Espécies e nomes comuns correspondentes com respectivos autores.....	32
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Porcentual de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) para os embriões de <i>Colossoma macropomum</i> , nos estádios embrionários de 1,2; 5; 8 e 13-hpf utilizados como controle.....	47
---	----

CAPÍTULO 3

Table 1. The percentages of live control <i>P. brachypomum</i> larvae (showing complete embryonic development) that developed from embryos chosen at 1.2, 5, 8 and 13 hours post-fertilization (hpf).....	65
---	----

CAPÍTULO 4

Table 1. The percentages of live control <i>P. brachypomum</i> larvae (showing complete embryonic development) that developed from embryos chosen at 1.2, 5, 8 and 13 hours post-fertilization (hpf).....	85
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- Análise de Variância

DNOCS- Departamento Nacional de Obras Contra as Secas

DMF- dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa

Gli - glicose

Glu - glicose

HpF- horas pós fertilização

UECE - Universidade Estadual do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 ESPÉCIES ESTUDADAS	16
2.1.1 TAMBAQUI (<i>Colossoma macropomum</i>)	16
2.1.2 PIRAPITINGA (<i>Piaractusbrachypomus</i>)	18
2.1.3 DIFICULDADES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	19
2.1.4 RESFRIAMENTO DE EMBRIÕES	20
2.1.5 DILUENTES E CRIOPROTETORES	21
3 JUSTIFICATIVA	23
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	24
5 OBJETIVOS	25
5.1 OBJETIVO GERAL.....	25
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
6 CAPÍTULO 1.	26
7 CAPÍTULO 2	39
8 CAPÍTULO 3	59

9 CAPÍTULO 4.....	78
10 CONCLUSÕES.....	95
11 PERSPECTIVAS.....	96
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

O declínio dos estoques naturais de peixes (FAO, 2013), resultante da exploração excessiva e das mudanças antropogênicas no meio ambiente, tem despertado um interesse na criação de banco de germoplasma para espécies aquáticas desde a década de 1990 (HARVEY, 1996). Pesquisadores tem desenvolvido métodos de criopreservação de sêmen de peixes de água doce da América do Sul, de importância comercial incluindo o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (STREIT JR. et al., 2007), a curimba ou curimatá, *Prochilodus lineatus* (MURGAS et al., 2007), o matrinxã, *Brycon amazonicus* (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2006) e a piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (MURGAS et al., 2004).

Desde a década de 1970, a criopreservação de embriões de mamíferos tem sido utilizada com sucesso (RALL, 1992). As primeiras tentativas de criopreservação de embriões de peixes foram conduzidas no final da década de 1970 e nos anos de 1980, em salmonídeos (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis* e *Oncorhynchus kisutch*) (BILLARD; ZHANG, 2001). Estas espécies apresentam embriões maiores que 1 mm de diâmetro e um amplo saco vitelínico.

As dimensões embrionárias determinam a razão superfície/volume, que possui uma relação inversa com o tamanho do embrião. A redução na razão superfície/volume resulta em um decréscimo no influxo de crioprotetores e no efluxo de água, dificultando o processo de desidratação, independentemente da permeabilidade das membranas embrionárias. Entretanto, os resultados obtidos com os primeiros estudos desestimularam a continuação das pesquisas, e espécies com embriões menores tornaram-se desde então objeto de ensaios experimentais (FORNARI, 2012).

Muitos estudos sobre criopreservação de embriões de peixes foram realizados em peixe-zebra (*Danio rerio*), uma espécie de peixe de água doce, modelo em estudos de reprodução. Seus embriões têm menos de 1 mm de diâmetro e são, provavelmente, os mais utilizados nos experimentos criobiológicos (CARDONA-COSTA, J.; FRANCISCO-SIMÃO; GARCIA-XIMENEZ, 2009; EL-BATTAWY; LINHART, 2009; GUAN; RAWSON, 2010; HAGEDORN et al., 1997; HIGAKI et al., 2009; LIU et al., 2001; ROBLES et al., 2004; SILAKES; BART, 2010).

Com o rápido desenvolvimento do cultivo de peixes nos últimos dez anos, foram realizadas algumas tentativas de criopreservação de espécies marinhas com embriões pequenos também foram realizadas, especialmente naquelas com grande valor comercial, tais como o linguado, *Paralichthys olivaceus* (ZHANG et al., 2003; CHEN; TIAN, 2005), o pregado, *Scophthalmus maximus* (CABRITA et al., 2003a; ROBLES et al., 2003), o dourado, *Sparus aurata* (BEIRAO et al., 2006; CABRITA et al., 2006); o pescada, *Pagrus major* (DING; XIAO, 2007) e o solha-de-inverno, *Pseudopleuronectes americanus* (CABRITA et al., 2003b; ROBLES et al., 2003).

No Brasil, os embriões das espécies de peixes de água doce possuem dimensões maiores que 1,0 mm de diâmetro, o que justifica a escassez de trabalhos sobre o assunto. A espécie-modelo de peixes de água doce em estudos reprodutivos têm sido a curimba ou curimbatá, *P. lineatus* (MILIORINI et al., 2011); mas também existem estudos com pacu, *P. mesopotamicus*, (LOPES et al, 2011; LOPES et al, 2012; TOMIITA; GONÇALVES; VIEGAS, 2008) e tambaqui, *Colossoma macropomum* (FORNARI, 2012)

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécies estudadas

2.1.1 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Serrasalmininae

Gênero: *Colossoma*

Espécie: *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818)

O tambaqui, *C. macropomum* (Fig. 1), é um peixe de piracema nativo das Bacias do rio Amazonas e seus afluentes, sendo considerado o maior caracídeo da Amazônia, atingindo comprimentos de até 1,0 m e peso além de 30 kg (GOULDING, 1988).



Figura 1. Exemplar adulto de *Colossoma macropomum*.

O tambaqui apresenta características importantes para a piscicultura como: a) hábito alimentar diversificado; b) rápido crescimento; c) facilidade na produção de alevinos; d) resistência ao manuseio; e) a elevadas temperaturas, f) capacidade de adaptar-se a ambientes com baixo nível de oxigênio dissolvido na água (ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005; VAL; VAL-ALMEIDA, 1995). Ainda, a espécie possui grande valor econômico e ecológico, pois apresenta grande aceitação no mercado e sua abundância vem sendo reduzida devido ao excesso de exploração pesqueira (SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2006).

Em relação à aquicultura, *C. macropomum* é a espécie nativa brasileira mais produzida comercialmente com produção superior a 30 mil ton/ano (FAO, 2010) e apresenta bons resultados em diferentes tipos de criação intensiva (CHELLAPA et al., 1995; VALENTI et al., 2000). Por outro lado, nos sistemas comerciais de produção a variabilidade genética é importante, pois possibilita a melhoria das características zootécnicas, como rusticidade, rápido crescimento, fácil adaptação e outras (SUQUET et al., 2000).

O tambaqui foi incluído no Programa Brasileiro de Melhoramento Genético, desenvolvido em várias instituições de pesquisa, cabendo destacar que somente a Embrapa possui oito unidades desenvolvendo trabalhos com esta espécie, onde também estão envolvidas nesse Programa dez universidades federais, três estaduais e uma universidade norte-americana (LOPES et al., 2009). Além disso, o tambaqui é uma de nossas espécies nativas que possui tecnologia de propagação artificial, fator que favorece a consolidação da atividade de seu cultivo (SUFRAMA, 2003).

2.1.2 Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*)

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Serrasalmininae

Gênero: *Piaractus*

Espécie: *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1818)

A pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Fig. 2), é um peixe que ocorre nas Bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, podendo atingir 80 cm e pesar até 20 kg. Esta espécie é a única do gênero encontrada na Bacia Amazônica (SOBRINHO et al., 1984).



Fonte: arquivo pessoal

Figura 2. Exemplar adulto macho de *Piaractus brachypomus*

Segundo KUBITZA (2004), a pirapitinga é considerada o terceiro maior peixe de escamas da Amazônia, perdendo apenas para o pirarucu (*Arapaima gigas*) e para o tambaqui (*C. macropomum*). Essa espécie tem habilidade de digerir tanto alimentos de origem vegetal quanto animal, alimentando-se principalmente de frutos, sementes, e de pequenos peixes (FERNANDES et al., 2004). Possui crescimento rápido, é rústica, resistente a elevadas temperaturas na água dos viveiros, ao manuseio, à enfermidades e a baixos níveis de oxigênio dissolvido. Apresenta, também, importantes vantagens como ótima adaptação a todo tipo de ração industrializada, altas taxas de eficiência alimentar, crescimento uniforme e acelerado, além de boa aceitação no mercado (SILVA et al., 1986; VÁSQUEZ-TORRES, 2005).

O Departamento Nacional de Obras contras as Secas (DNOCS) importou na década de 1970 alevinos dessa espécie para estudos biológicos e reprodutivos com o objetivo de criação em cativeiro. Os primeiros exemplares foram trazidos de Iquitos, no Peru, visando o povoamento dos açudes e estocagem em viveiros para seu cultivo intensivo (SOBRINHO et al., 1984)

2.1.3 Dificuldades na criopreservação de embriões

Embora se consiga de forma eficiente a criopreservação de sêmen de peixes, o mesmo não acontece ainda com embriões e ovócitos (FORNARI et al., 2010; HERRAÉZ, 2009, ZHANG et al., 2004). Os embriões de animais aquáticos, especialmente de peixes, apresentam mais dificuldades que os embriões de mamíferos em termos de criopreservação. Esses são mais sensíveis ao resfriamento e sua estrutura é complexa, com diferentes compartimentos e membranas, além de possuírem dimensões bem superiores às dos mamíferos. Em teoria, ovócitos (GUAN; RAWSON; ZHANG, 2010) e folículos

ovarianos (ANIL et al., 2011; TSAI; RAWSON; ZHANG, 2009) de peixes são mais facilmente congeláveis por possuírem menores dimensões, membranas mais permeáveis e menos complexas.

Dentre os problemas associados à criopreservação de embriões estão a redução da permeabilidade das membranas a água e a agentes crioprotetores, assim como a sensibilidade ao frio (GWO; STRAWM; ARNOLD, 1995; HAGEDORN et al., 1997; ZHANG; RAWSON, 1995). E tanto a permeabilidade como a sensibilidade variam nos estádios embriônicos na criopreservação (AHAMMAD; BHATTACHARYYA; JANA, 2003). Durante o desenvolvimento embrionário, o tamanho das células é reduzido devido a clivagem, entretanto a permeabilidade ao crioprotetor em estádios embrionários avançados pode ser reforçada em comparação aos estádios iniciais (CALVIN; MAISSE, 1998). Nos últimos 25 anos, atenção especial tendo sido direcionada à criopreservação de ovos e de embriões de peixes, mas até o momento os resultados são contraproducentes (ZHANG et al., 2008), e com isso é utilizado o resfriamento como alternativa, pois podem oferecer informações que colaborem com a criopreservação (FORNARI et al., 2010; STREIT JR. et al., 2007).

2.1.4 Resfriamento de embriões

A técnica de resfriamento consiste em submeter os embriões a uma solução crioprotetora e mantê-los estocados por um determinado período de tempo em baixas temperaturas com associação de um crioprotetor de ação intracelular a outro extracelular (HOLT, 2000). Em relação ao resfriamento de embriões, já foram realizados em espécies de peixes como a carpa, *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de solução e de crioprotetor em temperaturas variando de 4 °C a -2 °C (AHMMAD; BHATTACHARYYA;

JANA, 2002). Estudos mais recentes (LOPES et al., 2011; LOPES et al., 2012; STREIT JR. et al., 2007) mostraram ser possível armazenar embriões de *P. mesopotamicus* a baixas temperaturas, sem perdas significativas na taxa de eclosão, entretanto estudos com resfriamento de embriões de teleósteos ainda são escassos.

2.1.5 Diluentes e crioprotetores

A escolha do crioprotetor varia de acordo com a espécie. Para *O. mykiss*, o propileno glicol 2,5M não é tóxico e protege os ovos embrionários por uma hora a -7 °C (MAISSE et al., 1998). Para *Danio rerio*, o metanol permite uma proteção dos embriões por 3 horas a -5 °C (ZHANG; RAWSON, 1995) e por 1 hora a -5 °C em solução modificada de Hank e com remoção parcial de vitelo (LIU et al., 2001). Embriões de *C. carpio* podem ser mantidos por 10 horas a -5 °C em presença de DMSO (ZHANG et al., 1989) e até 7 dias à -2 °C em solução de metanol e trealose (AHAMMAD et al., 2002). Os resultados obtidos nas diferentes espécies mostram que a sobrevivência diminuiu rapidamente com a temperatura baixa.

Zhang e Rawson (1995) aplicaram sem sucesso a técnica de vitrificação de embriões de *D. rerio* onde houve formação de gelo intraembrionário, entretanto Robles et al. (2003) obtiveram bons resultados com a técnica no congelamento de embriões de *Pseudopleuronectes americanus*, espécie residente em regiões geladas do Ártico.

Embora os métodos de criopreservação de sêmen de peixes marinhos e de água doce vêm se consolidando, por outro lado a criopreservação de ovos e embriões tem feito pouco progresso (RAHMAN et al., 2008). Devido esse pouco avanço, pesquisas tem sido desenvolvidas no sentido de avaliar a toxicidade do crioprotetor nos diferentes estádios de desenvolvimento, como na espécie *Sillago japonica*, cujos embriões apresentaram

tolerância ao gradativo aumento de propileno glicol 20% realizado em cinco etapas (RAHMAN et al., 2008; RAHMAN et al., 2011)

Também foram avaliadas as formações de gelo intra e extracelular nos embriões de *P. major*, em diferentes taxas de resfriamento com metanol 10% (LI et al., 2009) e em diferentes concentrações de sacarose com metanol 9% (FORNARI et al., 2010).

A adição de antibióticos no meio também afeta o estoque de embriões resfriados (LAHNSTEINER, 2009), bem como, o tempo de resfriamento, conforme observado em espécies brasileiras (LOPES et al., 2011).

Silva Costa et al. (2012) analisaram a toxicidade de crioprotetores em embriões resfriados de *P. lineatus* em temperaturas de 0 a 5 °C por 12 horas e concluíram que os embriões apresentavam uma alta sensibilidade ao frio e que os tratamentos desenvolvidos não foram efetivos na proteção dos embriões contra ao frio, ocasionando médias de sobrevivência menores ou iguais ao controle do estágio e menores que o controle ambiental. Além disso, a Dimetilformamida (DMF), crioprotetor interno, apresentou-se extremamente tóxico aos embriões de *P. lineatus* em todas as fases de desenvolvimento (NINHAUS-SILVEIRA et al., 2012).

3 JUSTIFICATIVA

A criopreservação e o resfriamento de embriões de peixes são técnicas utilizadas para a constituição de bancos genéticos em programas de piscicultura e conservação de espécies selvagens ou ameaçadas ou, ainda, de importância econômica. Entretanto, existe a necessidade de pesquisas com resfriamento de embriões devido aos poucos relatos na literatura sobre as espécies em questão, o tambaqui, *C. macropomum* e a pirapitinga, *P. brachypomus*.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Embriões de tambaqui e pirapitinga apresentam taxa de eclosão satisfatória após resfriamento por até 12 horas às temperaturas de 2 °C ou -10 °C em soluções crioprotetoras.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a sobrevivência larval completa de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) após resfriamento à baixas temperaturas por até 12 horas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as diferentes fases de desenvolvimento de embriões de teleósteos pós-resfriamento;
- Verificar a taxa de sobrevivência e eclosão larval pós-resfriamento.

6 CAPÍTULO 1

RESFRIAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEIXES

(Cooling and cryopreservation of fish embryos)

Nathalie Ommundsen Pessoa*¹, Miriam Luzia Nogueira Martins de Sousa¹, Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista², Aldeney Andrade Soares Filho³, Célia Maria de Souza Sampaio¹

1.Universidade Estadual do Ceará. Centro de Ciências da Saúde. Curso de Ciências Biológicas. Laboratório de Carcinicultura.

2.Universidade Estadual do Ceará. Faculdade de Veterinária. Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Venenos de Serpentes e Plantas.

3.Universidade Federal do Ceará. Departamento de Engenharia de Pesca. Laboratório de Bioecologia.

*Endereço de correspondência: nathalieop@gmail.com

***Revisão aceita para publicação no periódico Ciência Animal ISSN 0104-3773 (2012)**

RESUMO

Nas últimas décadas, as populações naturais de peixes têm diminuído devido à degradação ambiental e pesca excessiva, o qual precipita a descaracterização e o desaparecimento do habitat natural e dos organismos que nele vivem. Isso tem suscitado um grande interesse na criação de bancos de genes para organismos aquáticos selvagens. Visando suprir esse desequilíbrio ecológico e aumentar os benefícios econômicos, a piscicultura tem gerado inúmeros trabalhos no âmbito de técnicas de cultivo, controle de doenças, avaliação dos gametas produzidos em cativeiro e técnicas para congelamento seminal e de embriões. A criopreservação de sêmen de peixes tem sido pesquisada e obtido sucesso, no entanto também é necessário otimizar protocolos de resfriamento para preservação de embriões. O conjunto dos resultados, entretanto mostram que há necessidade de escolher o crioprotetor ideal para os embriões da espécie.

Palavras-chave: Germoplasma. Resfriamento. Teleósteos.

ABSTRACT

In recent decades, the natural fish population have declines due to overfishing and environmental degradation, wich precipitates the disappearance of natural habitat and his living organisms. This situation increased the interest for the creation of gene banks for wild aquatic organism. The fisherie constantly generates numerous research about techniques to control diseases, evaluation of gametes quality produced in captivity and freezing process to sperm end embryos. Sperm cryopreservation has been investigates with success, however it is necessary optimize cooling protocol for embryos. The results of this reviews show the need more research to choose a optimal cryoprotectant for the fish species for embryos.

Keywords: Germoplasm. Cooling. Teleost.

INTRODUÇÃO

Os declínios nos estoques naturais de peixe no mundo em grande parte são resultantes da exploração excessiva e mudanças antrópicas no meio ambiente (Fao, 2011). Isso tem suscitado um grande interesse na criação de bancos de genes para organismos aquáticos selvagens (Harvey, 1996).

A estratégia ideal para a conservação de espécies ameaçadas é pela proteção e restauração de seus habitats nativos. Infelizmente, isso requer muito dinheiro e tempo além de ser um processo lento. Uma alternativa é estabelecer bancos de genes *ex situ* resfriados ou criopreservados, o que garantiria a manutenção das populações de peixe geneticamente puras, enquanto as condições de habitat para o repovoamento é realizado. Além disso, o rápido crescimento da indústria da aquicultura tem promovido a necessidade de produção rápida e entrega de espécimes, o que poderia ser feito de maneira mais eficiente pelo armazenamento criogênico de gametas e embriões (Donaldson, 1997).

Resfriamento e congelamento de embriões

Cientistas tem estudado a criopreservação de sêmen de importantes peixes de água doce da América do Sul, tais como: *Prochilus lineatus* (Murgas et al., 2007), *Brycon amazonicus* (Ninhaus-Silveira et al, 2006) e *Brycon orbinnyanus* (Murgas et al., 2004; Viveiros & Godinho, 2008). No entanto, também é necessário otimizar protocolos de resfriamento para preservação de embriões.

Desde 1970, a criopreservação de embriões tem sido aplicada com sucesso em algumas espécies de mamíferos (Dobrinsky, 2002) e alguns invertebrados marinhos, como mariscos (Chao et al., 1997), ouriços do mar (Asahina & Takahashi, 1979), e poliquetas (Olive &

Wang, 1997). Muitos estudos sobre criopreservação de embriões de peixes foram realizados em zebrafish (Hagedorn et al., 2004; Liu et al., 1998). Além disso, nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento de peixes em aquicultura marinha, algumas tentativas de criopreservação de embriões foram realizadas, especialmente naquelas com grande valor comercial, como *Paralichthys olivaceus* (Zhang et al., 2003; Chen & Tian, 2005), *Scophthalmus maximus* (Cabrita et al., 2003; Robles et al., 2003), *Sparus aurata* (Beirao et al., 2006; Cabrita et al., 2006) e *Pagrus major* (Ding & Xiao, 2007)

O desenvolvimento de embriões de peixes é influenciado pela temperatura. Dentro dos níveis de tolerância, em baixas temperaturas o desenvolvimento é mais lento e acelera com alta temperatura (Zhang & Rawson, 1995). Os principais problemas associados à criopreservação de embriões de peixe são a redução da permeabilidade das membranas à água e aos crioprotetores, bem como a sensibilidade do embrião ao frio (Hagedorn et al., 1997). Estas características dependem da fase de desenvolvimento do embrião, por exemplo: *Oncorhynchus mykiss* (Maddock, 1974; Haga, 1982) *Syngnathus scovelli* (Begovac & Wallace, 1987) *Cyprinus carpio* (Jaoul & Roubaud, 1982; Roubaud et al., 1985) *Danio rerio* (Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997) e *Carassius auratus* (Liu et al., 1993) congelados na etapa de pós-gástrula foram menos sensíveis ao frio. Em embriões de *Danio rerio*, o congelamento com a remoção do córion não afetou a susceptibilidade ao frio (Hagedorn et al., 1997).

Lahnsteiner (2008) atribui a alta sensibilidade, ao frio nos estádios iniciais e a sua queda progressiva à medida que ocorre o desenvolvimento, aos seguintes fatores: a) a rápida diferenciação afetada pela ação dos crioprotetores; b) a não formação completa do ovo imediatamente após a fertilização assim como a dureza do córion afetando o fluxo de água e a regulação osmótica tornando os estádios ontogenéticos iniciais mais permeáveis aos

crioprotetores que em outros estádios; e c) nos estádios iniciais embrionários, as vias metabólicas ainda não estão completamente desenvolvidas e não impedem totalmente os efeitos tóxicos dos crioprotetores.

Diluentes e crioprotetores

Como no caso do sêmen, a escolha do crioprotetor varia de acordo com a espécie. Para *Oncorhynchus mykiss*, o propileno glicol 2,5M não é tóxico e protege os ovos embrionários por uma hora a -7 °C (Maise et al., 1998). Para *Danio rerio* o metanol permite uma proteção dos embriões por 3 horas a -5 °C (Zhang & Rawson, 1995) e por 1 hora a -5 °C em solução modificada de Hank e com remoção parcial de vitelo (Liu et al., 2001). Embriões de *Cyprinus carpio* podem ser mantidos por 10 horas a -5 °C em presença de DMSO (Zhang et al., 1989) e até 7 dias à -2 °C em solução de metanol e trealose (Ahammad et al., 2002). Os resultados obtidos nas diferentes espécies mostram que a sobrevivência diminuiu rapidamente com a temperatura baixa.

Zhang & Rawson (1996) aplicaram sem sucesso a técnica de vitrificação de embriões de *Danio rerio* onde houve formação de gelo intraembrionário, entretanto Robles et al. (2005) obtiveram bons resultados com a técnica no congelamento de embriões de *Pseudopleuronectes americanus*, espécie residente em regiões geladas do Ártico.

Tabela 1. Espécies e nomes comuns correspondentes com respectivos autores.

Espécie	Nome comum	Autores
<i>Carassius auratus</i>	Peixinho-dourado	Liu et al., 1993
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa	Zhang et al., 1989; Ahammad et al., 2002; Jaoul & Roubaud, 1982; Roubaud et al., 1985
<i>Danio rerio</i>	Peixe-zebra	Zhang & Rawson, 1995; Hagedorn et al., 1997; Liu et al, 1998; Liu et al, 2001; Hagedorn et al., 2004; Lahnsteiner, 2008.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truta arco-íris	Maddock, 1974; Haga, 1982; Maisse et al., 1998
<i>Pagrus major</i>	Pargo	Ding & Xiao, 2007; Li et al., 2009.
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Falso-alabote-japonês	Zhang et al., 2003; Li & Chen, 2003; Chen & Tian, 2005.
<i>Syngnathus scovelli</i>	Peixe-cachimbo	Begovac & Wallace, 1987
<i>Prochilus lineatus</i>	Curimatã	Murgas et al., 2007; Silva Costa et al, 2012; Ninhaus-Silveira et al, 2012
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Solha de inverno	Robles et al., 2005.
<i>Sillago japonica</i>	Silago japonês	Rahman et al., 2008; Rahman et al., 2011
<i>Scophthalmus maximus</i>	Pregado	Cabrita et al., 2003; Robles et al., 2003
<i>Sparus aurata</i>	Dourada	Beirao et al., 2006; Cabrita et al., 2006
<i>Syngnathus scovelli</i>	Peixe-cachimbo	Begovac & Wallace, 1987

Embora os métodos de criopreservação de sêmen de peixe marinho e de água doce vêm se consolidando, por outro lado a criopreservação de ovos e embriões tem feito pouco progresso (Rahman et al., 2008). Devido esse pouco avanço, as pesquisas tem se desenvolvido no sentido de avaliar a toxicidade do crioprotetor nos diferentes estádios de desenvolvimento, como na espécie *Sillago japonica*, onde os embriões apresentaram boa

tolerância ao gradativo aumento de propileno glicol 20% realizado em 5 etapas (Rahman et al., 2008; Rahman et al., 2011)

Também foram avaliadas as formações de gelo intra e extracelular nos embriões de *Pagrus major*, em diferentes taxas de resfriamento com metanol 10% (Li et al., 2009) e em diferentes concentrações de sacarose com metanol 9%. A adição de antibióticos no meio também afeta o estoque de embriões resfriados (Lahnsteiner, 2009), bem como, o tempo de resfriamento, conforme observado em espécies brasileiras (Lopes et al., 2011).

Foram feitas análises de toxicidade de crioprotetores em embriões resfriados de *Prochilus lineatus* em temperaturas de 0 a 5 °C por 12 horas (Silva Costa et al, 2012) e concluiu-se que os embriões apresentam uma alta sensibilidade ao frio e que os tratamentos crioprotetores desenvolvidos não foram efetivos na proteção dos embriões contra ao frio, ocasionando médias de sobrevivência menores ou iguais ao controle do estágio e menores que o controle ambiental. Além disso, o crioprotetor Dimetilformamida (DMF) apresentou-se extremamente tóxico aos embriões de *Prochilus lineatus* em todas as fases de desenvolvimento (Ninhaus-Silveira et al., 2012).

CONCLUSÃO

A criopreservação e o resfriamento de embriões de peixes são técnicas que são utilizadas como ferramentas para a constituição de bancos genéticos em programas de piscicultura e conservação de espécies selvagens ou ameaçadas ou, ainda, de importância econômica. O conjunto dos resultados, entretanto, mostra que há necessidade de escolher o crioprotetor ideal para peixes, tanto para a criopreservação de sêmen como a de embriões.

REFERÊNCIAS

AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. **Cryobiology** v.44, p.114–121, 2002.

ASAHINA E., TAKAHASHI T., Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm, **Development, Growth & Differentiation** v.21, p.423–430, 1979.

BEGOVAC PC, WALLACE RC. Ovary of the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **J Morphology** v.193, p.117–133, 1987.

BEIRAO J., ROBLES V., HERRAEZ M.P., SARASQUETE C., DINIS M.T., CABRITA E., Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, **Aquaculture** v.261, p.897–903, 2006.

CABRITA E., ROBLES V., CHEREGUINI O., WALLACE J.C., HERRÁEZ M.P., Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*), **Cryobiology** v.47, p.204–213, 2003.

CABRITA E., ROBLES V., WALLACE J.C., SARASQUETE M.C., HERRÁEZ M.P., Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, **Aquaculture** v.251, p.245–255, 2006.

CHAO N.H., LIN T.T., CHEN Y.J., HSU H.W., ILIAO.C., Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam, **Aquaculture** v.155, p.31–44, 1997.

CHEN S.L., TIAN Y.S., Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification, **Theriogenology** v.63, p.1207–1219, 2005.

DING F.H., XIAO Z.Z., LI J., Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos, **Theriogenology** v.68, p.702–708, 2007.

DOBRINSKY J.R., Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos, **Theriogenology** v.57, p.285–302, 2002.

DONALDSON E.M., The role of biotechnology in sustainable aquaculture, In: J.E. BARDACH (Ed.), **Sustainable Aquaculture**, Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 1997, pp. 101–126.

FAO. Food and Agriculture Organization. **World fisheries production by capture and aquaculture, by country. 2011.**

HAGA, Y. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. **Bull Jap Soc Sci Fish** v.48, p.1569 –1572, 1982.

HAGEDORN M, HSU E, KLEINHANS FW, WILDT DE. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. **Cryobiology** v.34, p.335– 347, 1997.

HAGEDORN M., PETERSON A., MAZUR P., KLEINHANS F.W., High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-cooling is not an option, **Cryobiology** v.49, p.181–189, 2004.

HARVEY B., Banking fish genetic resources: the art of the possible, In: F. DiCastri, T. Younes (Eds.), **Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership**, CAB International, Wallingford, UK, 1996, pp. 439–445.

JAOUL A, ROUBAUD P. Resistance de l’oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. **Can J Zool** v.60, p.409 –19, 1982.

LAHNSTEINER F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology** v.69, p.384 –396, 2008.

LAHNSTEINER F. Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos **Theriogenology** v.72, p.333–340, 2009.

LI, L.L. ZHANG, Q.H., LIU, X.Z., XU Z.Z., . XIAO, D.Y., MA, S.H., XU , Q.Z. XUE. Extra- and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates **Cryobiology** v.59, p..48–53, 2009.

LIU K, CHOU T, LIN H. Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. **Aquatic Living Resources** v.6, p.145–153, 1993.

LIU X.H., ZHANG T., RAWSON D.M., Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol, **Cryoletters** v.19, p.309–318, 1998.

LIU X.-H., ZHANG T., RAWSON D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology** v.55, p.1719-1731, 2001.

LOPES T. S., ROMAGOSA E., STREIT JR D. P., RIBEIRO R. P., DIGMAYER M. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours **Theriogenology** v.75, p.570–576, 2011.

MADDOCK BG. A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. **Progressive Fish Culturist** v.36, p.219 –222, 1974.

MAISSE, G.; LABBE, C.; OGIER DE BAULNY, B.; LEVERONI, S.; HAFFRAY, P. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. INRA. **Prod. Anim.**, v.11, n.1, p.57-65, 1998.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FRANCISCATTO, R; MARIA, A. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. **Rev. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FREITAS, R; PEREIRA, J. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Rev. Bras. Zoot.**, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

NINHAUS-SILVEIRA, A; SILVA COSTA, R.; VELARDE, J.M.C.; SENHORINI, J.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Toxicidade de crioprotetores aos embriões de *Prochilodus lineatus*. In: V AQUACIÊNCIA, Palmas, 2012.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; SILVEIRA, R.V.; SENHORINI, J.A.; ALEXANDRE, J.S. DE; CHAGURI, M.P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. **Boletim técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 19, p. 1-8, 2006.

OLIVE P.J.W., WANG W.B., Cryopreservation of *Nereis virens* (polychaeta Annelida) larvae: the mechanism of cryopreservation of a differentiated metazoan, **Cryobiology** v.34, p.284–294, 1997.

RAHMAN M., MAJHI S.K., SUZUKI T. , MATSUKAWA S. , STRÜSSMANN C.A., TAKAI R. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica* **Cryobiology** v.57, p.170–174, 2008.

RAHMAN M., MAJHI S.K., SUZUKI T. , MATSUKAWA S., WATANABEA M., Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos **Theriogenology** v.75, p.248–255, 2011.

ROBLES V., CABRITA E., REAL M., ÁLVAREZ R., HERRÁEZ M.P., Vittrification of turbot embryos: preliminary assays, **Cryobiology** v.47, p.30–39, 2003.

ROBLES V., CABRITA E., FLETCHER G.L., SHEARS M.A., KING M.J., HERRAEZ M.P.. Vittrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species **Theriogenology** v.64, p.1633–1646, 2005.

ROUBAUD P, CHAILLOU C, SJAFEI D. Variations cycliques de la toletance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de lembryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). **Can J Zool** v.63, p.657– 663, 1985.

SILVA COSTA,R.; VELARDE,J.M.C.; SENHORINI, J.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Resfriamento de embriões de peixes neotropicais.In:V AQUACIÊNCIA, Palmas,2012.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.34, n.2, 2008.

ZHANG X.S., ZHAO L., HUA T.C., ZHU H.Y.,. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. **Cryo Letters**, v.10, p.271-278, 1989.

ZHANG T, RAWSON DM. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology** v.32, p.239–246, 1995.

ZHANG T., RAWSON D.M., Feasability studies on vittrification of intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. **Cryobiology** v.33, p.1-13, 1996.

ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C.; LIU, X.Z.; XU, Y.Y.; WANG, C.L.; SAWANT, M.S.; LI, J.; CHEN, S.L. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. **Theriogenology**, v. 60, n°5, p. 989-996, 2003.

7 CAPÍTULO 2

RESFRIAMENTO DE EMBRIÃO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*), EM DIFERENTES TEMPOS DE ESTOCAGEM

Chilling of tambaqui (*Colossoma macropomum*) embryos at different times of storage.

**Nathalie Ommundsen Pessoa*¹, Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista²,
Francisco Gerson Mendes de Souza Filho³, Míriam Luiza Nogueira Martins de
Sousa¹, Athur Vinícius Lourenço¹ e Célia Maria Souza Sampaio¹**

¹ Laboratório de Carcinicultura, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700, Itaperi Fortaleza, CE 60714-903, Brasil

² Laboratório de Histologia de Efeitos Causados por Venenos de Serpentes e Plantas, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil, 1700, Itaperi Fortaleza, CE 60740-000, Brasil

³ Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bloco 910, CEP 60455-760, Fortaleza CE, Brasil

***Artigo publicado pela Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (Brazilian Journal of Hygiene and Sanity Animal) INSS 1981-2965, v. 07, n. 2, p. 323-344, jul-dez, 2013**

RESUMO

A técnica de criopreservação de embriões de peixe ainda não apresenta resultados eficientes, entretanto, o resfriamento de embriões já vem sendo utilizado com resultados satisfatórios. O objetivo desse trabalho foi realizar resfriamento de embriões de *Colossoma macropomum* submetidos à temperatura de 2 °C em diferentes tempos de estocagem. Foram utilizados embriões nos seguintes estádios embrionários: blastoderme - 1,2-horas pós-fertilização (hpf), epibolia - 5-hpf ; fechamento do blastóporo - 8-hpf; aparecimento da vesícula óptica no embrião - 13-hpf. De cada fase ontogenética foram selecionados cem embriões que foram tratados com solução de glicose 0,5 M com metanol 10%, glicose 0,5 M com metilglicol 10% e glicose 0,5 M com dimetilsulfóxido (DMSO) e resfriados a 2 °C por 6, 8, 10 e 12 horas. A análise estatística foi feita por ANOVA e teste de Tukey com significância de 5%. Foi observada uma diferença significativamente superior na média de larvas vivas com desenvolvimento completo no grupo tratado com solução de glicose-metanol e uma maior sobrevivência nos embriões em estádios de desenvolvimento mais adiantados (8-hpf e 13-hpf). Concluiu-se, portanto, que os estádios embrionários de fechamento de blastóporo (8-hpf) e aparecimento de vesícula óptica (13-hpf) podem ser considerados os mais recomendados para a utilização em protocolo de resfriamento de embriões de *C. macropomum* mantidos até 8 horas a 2 °C.

Palavras-chave: Aquicultura, peixes da América do Sul, estágio de desenvolvimento, resfriamento, sobrevivência larval.

ABSTRACT

The technique of cryopreservation of fish embryos has not efficient results yet, however, the cooling of embryos has been used with satisfactory results. The aim of this study was cooling embryos *Colossoma macropomum* subjected to a temperature of 2 ° C at different times of storage. Embryos were used in the following embryonic stages: blastoderm - 1.2 hours post-fertilization (hpf), epibolia - 5-hpf; closing blastopore - 8-hpf; appearance of the optic vesicle - 13 hpf. One hundred embryos, of each stage of ontogeny selected, were treated with glucose 0.5 M solution with 10% methanol, glucose 0.5 M with 10% methyl glycol and glucose 0.5 M in dimethylsulfoxide (DMSO) and cooled at 2 ° C for 6, 8, 10 and 12 hours. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey test with 5% significance. We observed a significantly higher difference in complete development of live larvae with the group treated with methanol solution of glucose and a greater survival in the embryos at earlier developmental stages (8-hpf and 13-hpf). It is concluded, therefore, that the embryonic stages of closing blastopore (8-hpf) and appearance of the optic vesicle (13 hpf) can be considered the most recommended for use in cooling protocol of embryos of *C. macropomum* maintained for 8 hours at 2 ° C.

Keywords: Aquaculture, fish of South America, embryonic development, cooling, larval survival.

INTRODUÇÃO

Desde 1970, a criopreservação de embriões tem sido aplicada com sucesso em algumas espécies de mamíferos (DOBRINSKY 2002) e alguns invertebrados marinhos, como mariscos (CHAO et al., 1997), ouriços do mar (ASAHINA & TAKAHASHI 1979) e poliquetas (OLIVE & WANG 1997), além de estudos sobre criopreservação de embriões de *zebrafish* (LIU et al. 1998, HAGEDORN et al., 2004). Além disso, nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento da piscicultura, algumas tentativas de criopreservação de embriões foram realizadas, particularmente em espécies com grande valor comercial, como *Paralichthys olivaceus* (CHEN & TIAN 2005), *Scophthalmus maximus* (CABRITA et al., 2003a, ROBLES et al., 2003), *Sparus aurata* (BEIRÃO et al., 2006; CABRITA et al., 2006) e *Pagrus major* (DING & XIAO 2007), entretanto sem resultados satisfatórios, devido a alta sensibilidade ao frio dos embriões de peixe.

LAHNSTEINER (2008) atribui essa sensibilidade ao frio nos estádios iniciais e a sua queda progressiva à medida que ocorre o desenvolvimento, aos seguintes fatores: (a) a rápida diferenciação afetada pela ação dos crioprotetores; (b) a não-formação completa do ovo imediatamente após a fertilização assim como a dureza do córion afetando o fluxo de água e a regulação osmótica tornando os estádios ontogenéticos iniciais mais permeáveis aos crioprotetores que em outros estádios; e (c) nos estádios iniciais embrionários, as vias metabólicas ainda não estão completamente desenvolvidas e não impedem totalmente os efeitos tóxicos dos crioprotetores. Sendo assim, a criopreservação de embriões de peixes ainda não é feita com eficiência, entretanto, o resfriamento de embriões pode ser uma alternativa.

A técnica de resfriamento consiste em submeter os embriões a uma solução crioprotetora e mantê-los estocados por um determinado período de tempo em baixas temperaturas com

associação de um crioprotetor de ação intracelular com outro extracelular (HOLT 2000). Em relação ao resfriamento de embriões, já foram realizados em espécies como *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações de solução e crioprotetor em temperaturas variando de 4 °C a -2 °C (AHMMAD et al., 2002). Estudos mais recentes (STREIT Jr et al., 2007; LOPES et al., 2011; LOPES et al., 2012) mostraram ser possível armazenar embriões de *P. mesopotamicus* a baixas temperaturas, sem perdas significativas na taxa de eclosão, entretanto estudos com resfriamento de embriões de teleósteos ainda são escassos.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe migrador pertencente à ordem Characiformes, composta por espécies oriundas da Bacia Amazônica e do rio Orinoco. Entre as espécies nativas brasileiras de água doce, o tambaqui representa a maior produção na aquicultura brasileira, superado somente pelas espécies exóticas tilápia (*Oreochromis niloticus*) e carpa (*C. carpio*) (IBAMA 2008). Existem poucos relatos sobre resfriamento a temperatura negativa de embriões dessa espécie e com resfriamento a temperatura próxima de zero, esse trabalho é o primeiro realizado. O objetivo desse trabalho foi realizar resfriamento de embriões de *C. macropomum* submetidos em solução de glicose combinada a crioprotetores internos, a temperatura de 2 °C em diferentes tempos de estocagem.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi registrado sob nº11518562-3/73 pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA). Embriões de *C. macropomum* foram coletados, em janeiro e fevereiro de 2012, no Centro de Pesquisas em Aquicultura (CPAq) do DNOCS, no município de Pentecoste, Ceará, situado a 03°45'00"S e 039°10'24"W e distante 82 km de Fortaleza. Os reprodutores possuíam, em média, quatro anos de idade e foram mantidos em tanques de densidade de 0,4 kg de peixe por m². Foi

utilizado um *pool* de ovos proveniente das desovas de seis casais, resultantes da indução hormonal. Para isso, foram injetados (intramuscular) $5,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de extrato bruto de pituitária de carpa (cPE; Danúbio Aquacultura, Blumenau, Santa Catarina) em duas doses ($0,5$ e $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), com intervalo de 12 horas para fêmeas, e $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (dose única) para machos. Após 275 horas/grau, ocorreu a extrusão dos gametas e os ovos recém-fertilizados foram transferidas para incubadoras cônicas (18L) com fluxo contínuo de água. A sequência de eventos ocorridos da fase de desenvolvimento do embrião até a eclosão de larvas foi acompanhada permitindo assim, avaliar como ocorria o desenvolvimento. A temperatura da água foi mantida em $27^\circ\text{C} \pm 1,0$.

O grupo controle foi utilizado para verificar a influência da seleção de ovos viáveis, em momentos distintos da fase ontogenética, na taxa de eclosão, mesmo sem passar por tratamento de resfriamento. Este grupo foi composto por quatro tratamentos, sendo que cada um representava os seguintes estádios embrionários (LOPES et al., 2011): Tratamento controle 1: blastoderme - 1,2-horas pós-fertilização (hpf), (~ 64 células); Tratamento controle 2: epibolia - 5-hpf (25% movimento de epibolia); Tratamento controle 3: fechamento do blastóporo - 8-hpf (90% movimento de epibolia); Tratamento controle 4: aparecimento da vesícula óptica no embrião - 13-hpf. Para isso, foram utilizadas 12 incubadoras de 3 L, com fluxo contínuo, sem passar por solução crioprotetora até o momento de eclosão das larvas (aproximadamente 18-hpf).

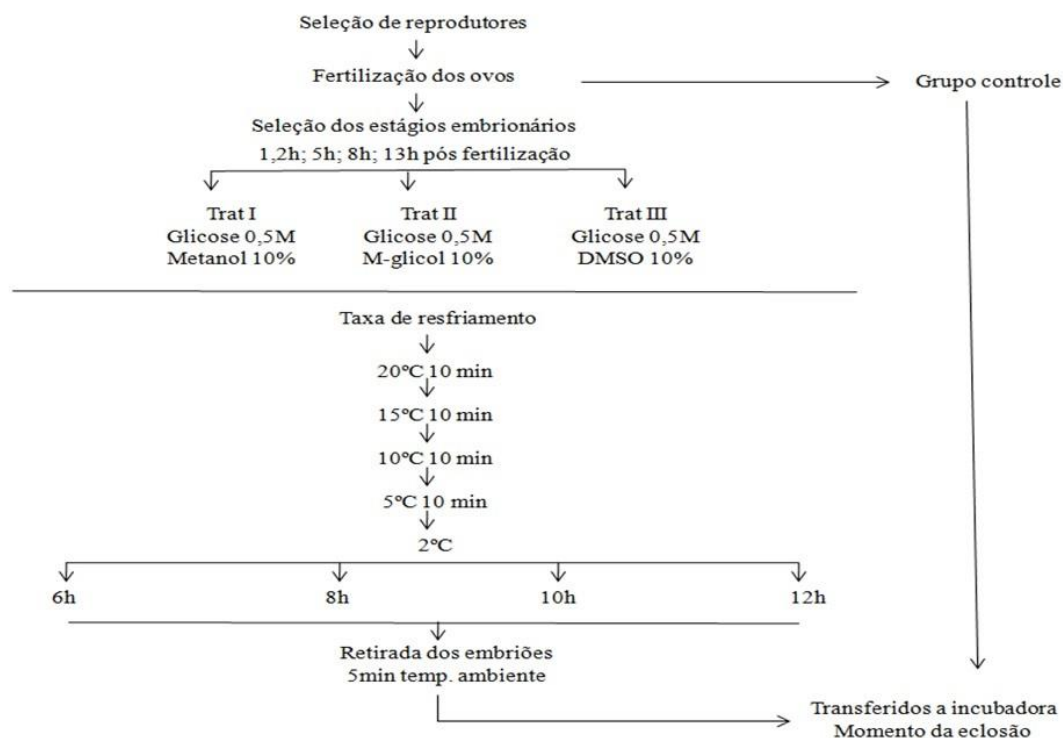


Fig.1. Fluxograma do resfriamento de embriões de *C. macropomum* nos quatro estádios embrionários em quatro tempos de estocagem. Adaptado de Lopes et al. (2011).

Para compor o grupo tratamento, embriões viáveis nos diferentes estádios embrionários (1,2; 5; 8 e 13-hpf) foram coletados das incubadoras, sendo que cada unidade experimental foi acondicionada em tubos *vacutainer* e recebeu solução crioprotetora contendo glicose 0,5 M e metanol 10% ou glicose 0,5 M e DMSO 10% ou glicose 0,5 M e metilglicol 10%. Em seguida, estes tubos foram levados a caixas de isopor e gelo, cuja temperatura foi constantemente controlada. Desta forma, os embriões passaram por uma curva de resfriamento, em que a temperatura caiu cerca de 0,5 °C por minuto, até atingirem 2 °C, sendo mantidos em quatro tempos de estocagem, 6, 8, 10 e 12 horas. Os tubos foram retirados do refrigerador, aclimatados por cinco minutos em água a temperatura ambiente, e em seguida transferidos para incubadoras de 3 L. Cada tubo ocupou uma incubadora com

fluxo de água contínuo, onde permaneceram até completar o desenvolvimento embrionário (Fig. 1).

Ao completar o desenvolvimento embrionário (aproximadamente 18-hpf), tanto o grupo controle quanto os grupos tratamentos foram retirados das incubadoras para estimar o número de larvas vivas com desenvolvimento completo. Foi analisado o total de larvas vivas de embriões tratados por hora de resfriamento, pela sobrevivência nas diferentes fases ontogenéticas. Também foi avaliado o efeito dos tratamentos pelas horas de resfriamento e pelos estádios de desenvolvimento.

Os ovos viáveis selecionados foram divididos em grupo controle e grupo tratamento (resfriamento em quatro tempos de estocagem). Cada unidade experimental foi composta por 100 embriões viáveis. Para o grupo controle houve três repetições. Para os grupos tratados foram realizadas sete repetições.

Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Quando os dados não seguiam a distribuição normal, transformações arco seno foram realizadas. Os dados foram testados para diferenças significativas por ANOVA (MILONE, 2009), seguido do Teste de Tukey, quando necessário. O nível de significância para todos os testes estatísticos foi de 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (THE R PROJECT FOR STATISTICAL COMPUTING, version 2.15).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de larvas vivas, a partir dos ovos selecionados viáveis para os tratamentos do grupo controle são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentual de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) para os embriões de *C.macropomum*, nos estádios embrionários de 1,2; 5; 8 e 13-hpf utilizados como controle.

Estádio embrionário	Larvas vivas (%)
blastoderme 1,2 hpf	88.1±1.0
epibolia 5-hpf	83.7±1.5
fechamento do blastóporo 8 hpf	93.3±1.1
aparecimento da ves. óptica 13-hpf	97.4±1.1

Cada média ± erro padrão da média representa os dados de três repetições com 100 embriões cada.

Em relação as larvas vivas com desenvolvimento embrionário completo, foi observada diferença estatística significativamente superior ($p \leq 0,05$) na média dos embriões resfriados em solução de glicose-metanol quando comparados com os tratamentos glicose-metilglicol ou glicose-DMSO (Fig. 2). No tratamento glicose-metanol, foi observada uma diminuição estatística significativa ($p \leq 0,05$) no número de larvas à medida que o tempo de estocagem aumentou, resultando maior média a dos embriões resfriados por 6 horas. Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na média de sobrevivência larval entre os tratamentos glicose- metilglicol e glicose-DMSO, quando resfriados por 6 e 12 horas, entretanto, no tratamento glicose-metilglicol, a sobrevivência é significativamente menor ($p \leq 0,05$) em relação aos outros tratamentos quando resfriado por 8 e 10 horas (Fig. 2).

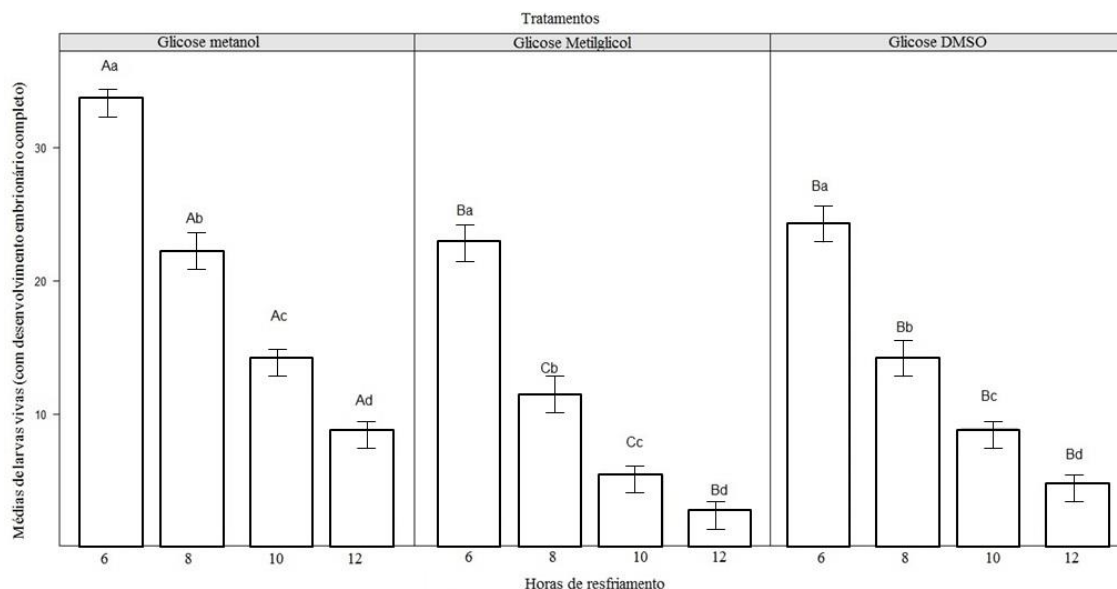


Fig. 2. Média de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) de *C. macropomum* tratados e resfriados por diferentes tempo de estocagem. Letras maiúsculas representam diferenças entre crioprotetores para os mesmos tempos de estocagem e letras minúsculas representam diferenças entre os tempos de estocagem para o mesmo tratamento. ANOVA e teste de Tukey.

Os embriões tratados com solução de glicose-metanol apresentaram desenvolvimento larval completo estatisticamente superior ($p \leq 0,05$) comparados aos outros tratamentos. Nos estádios de 1,2-hpf e 5-hpf não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) enquanto a fase de 13-hpf foi significativamente superior ($p \leq 0,05$) em relação as demais fases ontogenéticas, tanto do grupo tratado com glicose metanol quanto nos demais tratamentos (Fig. 3).

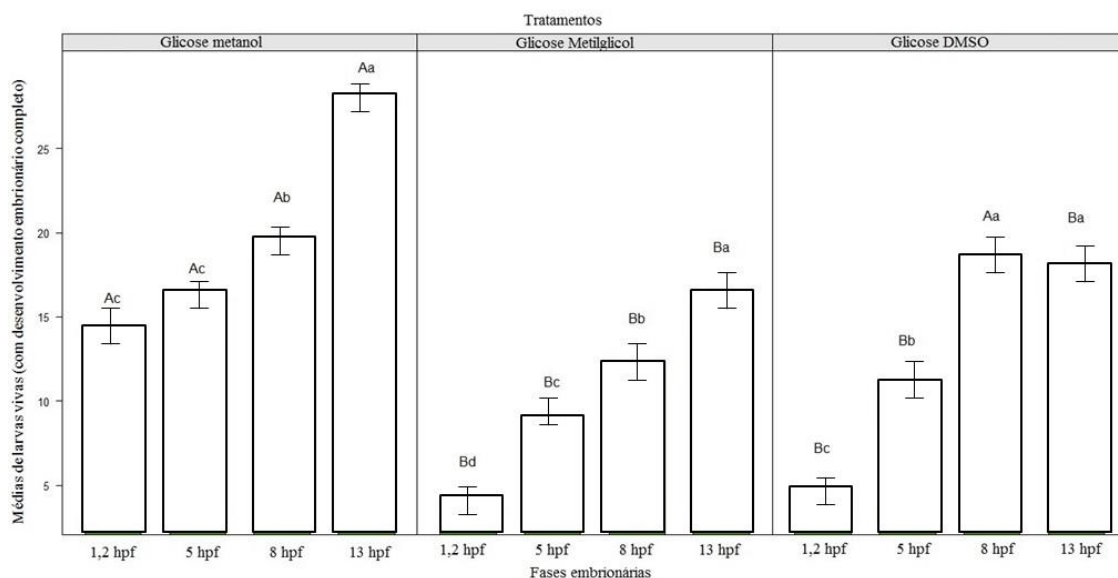


Fig. 3. Média de larvas vivas (com desenvolvimento embrionário completo) para os embriões de *C. macropomum*, tratados com glicose-metanol, glicose-metilglicol e glicose-DMSO, nas diferentes fases ontogenéticas. Letras maiúsculas representam diferenças entre crioprotetores nas mesmas fases ontogenéticas e letras minúsculas representam diferenças entre fases ontogenéticas no mesmo tratamento. ANOVA e teste de Tukey.

Não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nas médias de larvas vivas entre os grupos tratados com glicose-metilglicol e glicose-DMSO, com exceção à fase de fechamento de blastóporo (8-hpf) do tratamento glicose-DMSO, que não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) com a mesma fase (8-hpf) do tratamento glicose-metanol (Fig. 3). Na fase de blastoderme (1,2-hpf) do tratamento glicose-metilglicol foi observada a menor média de larvas vivas dos grupos tratados. Foi observado que todos os embriões tratados apresentaram médias de larvas vivas decrescentes com o aumento de tempo de resfriamento. Entretanto, os embriões tratados com glicose-metanol apresentaram médias estatísticas significativamente superiores ($p \leq 0,05$) comparadas aos demais tratamentos, tanto nas diferentes fases ontogenéticas (1,2; 5; 8; 13-hpf) como no tempo de estocagem a 2 °C (6,8,10, 12 horas) (Fig. 4). Nos primeiros estádios embrionários (1,2-hpf; 5-hpf) foram observadas em todas as repetições, larvas vivas com

desenvolvimento completo em todos os tempos de resfriamento (6, 8, 10, 12 horas) para embriões tratados com glicose-metanol. Para os tratamentos glicose-metilglicol e glicose-DMSO, o número de larvas vivas foi zero a partir de 10 horas de resfriamento.

Na fase de fechamento de blastóporo (8-hpf), não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) na média de larvas vivas nos tratamentos glicose-metanol e glicose-DMSO nos tempos de resfriamento 8 e 10 horas, entretanto, por 12 horas de estocagem a 2 °C, observou-se um aumento estatístico significativo ($p\leq0,05$) na média de larvas vivas de embriões tratados com glicose-metanol (Fig. 4).

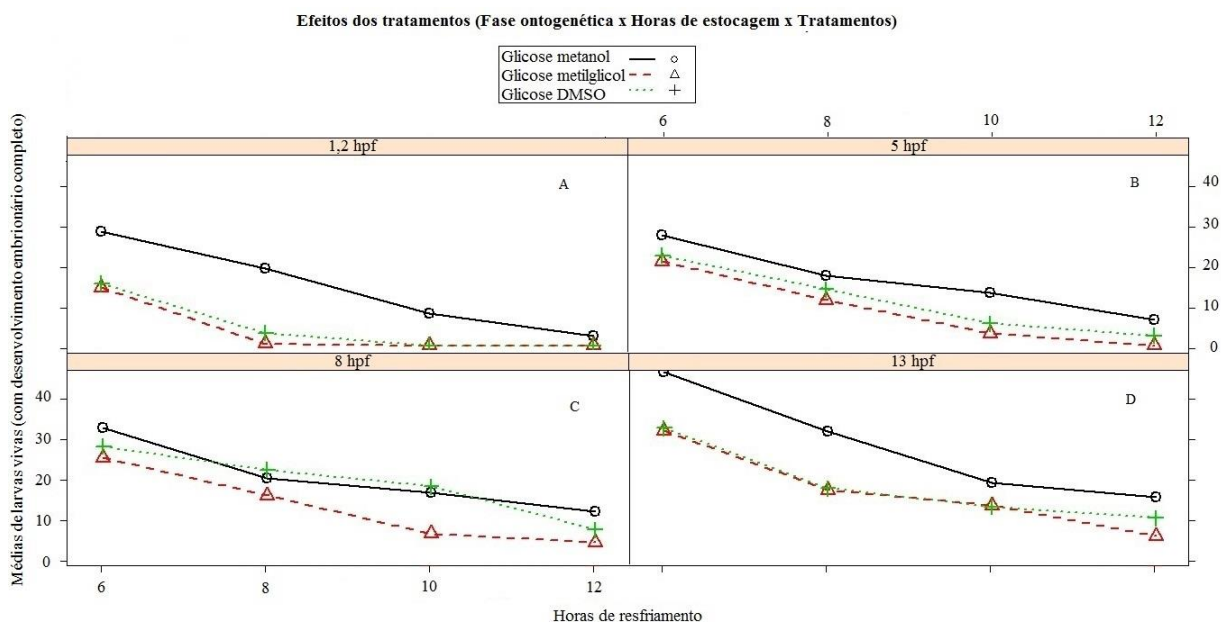


Figura 4- Médias de larvas de *C. macropomum* de embriões em diferentes estádios ontogenéticos e resfriados em glicose combinada com metanol, metilglicol ou DMSO por 6 a 12 horas. A) Blastoderme (~1,2h pós fertilização). B) Epibolia (~5 h pós fertilização). C) Fechamento do blastóporo (~8h pós fertilização). D) Aparecimento da vesícula óptica (~13h pós fertilização)

Nas fases ontogenéticas de fechamento do blastóporo e aparecimento de vesícula óptica (8-hpf; 13-hpf) ocorreu um aumento de larvas nos tempos de resfriamento maior (10, 12 h) nos tratamentos glicose-metanol e glicose-DMSO. Entretanto, no estágio de 13-hpf, há uma diferença estatística significativamente maior ($p\leq0,05$) de larvas vivas de embriões

tratados com glicose-metanol quando comparada aos demais tratamentos (Fig. 4). Os embriões tratados com solução de glicose-metilglicol apresentaram as médias de sobrevivência significativamente inferiores ($p \leq 0,05$) em relação aos tratamentos glicose-DMSO e glicose-metanol respectivamente.

A sensibilidade do embrião ao frio está relacionada com o tipo, número e mecanismo de reparação das células e tecidos, ou seja, quanto maior a complexidade das células, menor a possibilidade dessas células reagirem da mesma forma quando expostas ao frio (DINNYES et al., 1998). Nesse estudo foi observado que, o maior número de larvas vivas com desenvolvimento completo apareceram nos tempos de estocagem mais curtos e a sobrevivência das larvas maior a medida que os estádios embrionários avançavam, sugerindo que a temperatura de armazenamento tem uma influência acentuada no sucesso de eclosão de embriões resfriados de *Colossoma macropomum*. Resultados semelhantes aos observados por AHAMMAD et al. (2002) no resfriamento de embriões de *C. carpio*, cuja viabilidade dos embriões mantidos a 4 °C foi superior a dos embriões mantidos a -2 °C, quando mantidos resfriados por mais tempo. O fato dos embriões terem apresentado menor resistência quando expostos a períodos mais prolongados, pode estar relacionado à exposição a baixa temperatura, o que evidencia a sensibilidade do embrião de *C. macropomum* quando estocado por longo período. Os estádios embrionários mais resistentes para o *C. macropomum*, foram os intermediários, com 8 e 13-hpf, que corroboraram com os resultados de AHAMMAD et al. (2003), utilizando embriões de *Labeo rohita*, cuja maior sobrevivência dos embriões ocorreu também quando pode-se visualizar os batimentos cardíacos. ZHANG et al. (2003) afirmaram que durante o processo ontogenético podem ocorrer “falhas” que inviabilizam o sucesso da criopreservação, como ocorreu no estágio de 1,2-hpf, em que foi verificado nenhum

embrião viável. Do mesmo modo ZHANG & RAWSON (1995), trabalhando com embriões de *Danio rerio* em estádios iniciais, também verificaram este fato. No presente estudo, isto pode ser atribuído ao fato de *C. macropomum* ser uma espécie tropical, fazendo com que a sensibilidade seja mais elevada nestes estádios de desenvolvimento embrionário, devido à elevada quantidade de lipídios no embrião, dificultando a ação de proteção dos crioprotetores. Além disto, as fases iniciais de desenvolvimento embrionário são susceptíveis ao efeito tóxico sobre as células (BART 2000), ou seja, as vias metabólicas reguladoras nestes estádios ainda se encontram pouco desenvolvidas, sendo incapazes de compensar a toxicidade dos crioprotetores (LAHNSTEINER 2009).

Dos crioprotetores usados, a associação de glicose com metanol apresentou maior taxa de larvas viáveis. A utilização do metanol como crioprotetor de embriões de peixe vem apresentando bons resultados (STREIT Jr et al., 2007; LOPES et al., 2011, 2012), sendo este potencializado quando associado a crioprotetor extracelular (DENNISTON et al. 2000). Os crioprotetores extracelulares mais utilizados são sacarose, glicose e trealose (NIEMANN 1991, DENNISTON et al., 2000). Artigos de resfriamento de embriões de *Piaractus mesopotamicus* e *Prochilodus lineatus* vem tido bons resultados no uso de sacarose associada à metanol (LOPES et al. 2011; LOPES et al. 2012; NINHAUS-SILVEIRA et al. 2012) e em resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus*, a associação glicose-metanol apresentou taxas de eclosão inferiores quando comparada à sacarose-metanol (STREIT Jr et al. 2007). A associação glicose-metanol tem tido sucesso na criopreservação de gametas de espécies como *P. lineatus* (VIVEIROS et al., 2010), glicose-metanol e glicose-metilglicol em *Piaractus brachypomum* (NASCIMENTO et al., 2010). FORNARI (2012) obteve bons resultados no resfriamento de embriões de *C.*

macropomum em solução de sacarose-metanol a -8 °C, entretanto, não há relatos de resfriamento de embriões de *C. macropomum* utilizando glicose como crioprotetor externo. Apesar de não ter sido observado resultados satisfatórios com o dimetilsulfóxido no resfriamento de embrião de *C. macropomum*, nesse trabalho, em embriões de “red drum” (*Sciaenops ocellatus*), ROBERTSON et al. (1988) que testaram glicerol, DMSO, metilglicol, metanol, sacarose e sal marinho, observaram que o metanol e o DMSO apresentaram menor toxidez para a espécie que os outros crioprotetores testados. Porém, para algumas espécies como em embriões de robalo (*Scophthalmus maximus*), o DMSO foi menos tóxico que o metanol e o metilglicol como verificaram CABRITA et al. (2003b). A ação tóxica do crioprotetor também pode estar relacionada com as fases do desenvolvimento do embrião, como demonstraram DINNYÉS et al. (1998) com carpa (*Cyprinus carpio*), em estádios de mórula e segmentação, o DMSO foi menos tóxico que o metanol, por outro lado, quando os embriões de carpa apresentavam o coração batendo, o metanol foi menos tóxico.

O crioprotetor metilglicol mostrou-se inapropriado para o resfriamento de embriões de *C. macropomum*, apresentando taxa de eclosão significativamente inferior aos crioprotetores metanol e dimetilsulfóxido, resultado semelhante obtido em resfriamento de embriões de *P. mesopotamicus* por STREIT Jr et al. (2007). A toxidez do crioprotetor metilglicol pode estar relacionado à interferência deste crioprotetor no metabolismo do embrião, o que poderia ter provocado uma desestruturação celular e, conseqüentemente, a morte do embrião. De acordo com KUSUDA et al. (2002), a susceptibilidade dos embriões dos embriões ocorre em função da degeneração celular e das proteínas da membrana nuclear, devido a desidratação e aumento na concentração salina em decorrência do contato com o crioprotetor.

CONCLUSÃO

Concluiu-se, portanto, que os estádios embrionários de fechamento de blastóporo (8-hpf) e aparecimento de vesícula óptica (13-hpf) podem ser considerados mais recomendados para a utilização em protocolo de resfriamento de embriões de *C. macropomum* mantidos até 8 horas a 2 °C, sendo que o melhor resultado foi observado no estágio de 8-hpf estocado por seis horas. Entretanto, fatores relacionados a injúrias no resfriamento e, controle total da permeabilidade e osmorregulação do embrião devem ser considerados além de testes com outros tipos de crioprotetores extracelulares.

REFÊRENCIAS

- Ahammad M.M., Bhattacharyya D. & Jana B.B. 2002. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology* 44:114-121.
- Ahammad M.M., Bhattacharyya D. & Jana B.B. 2003. Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* 46:1-16.
- Asahina E. & Takahashi T. 1979. Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm. *Development, Growth and Differentiation* 21:423-430.
- Bart A. 2000. New approaches in cryopreservation of fish embryos, p.179-187. In: Tiersch T.R. & Mazik P.M. (Eds), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge. 1034p.

- Beirão J., Robles V., Herraéz M.P., Sarasquete C., Dinis M.T. & Cabrita E. 2006. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* 261:897-903.
- Cabrita E., Robles V., Chereguini O. & Wallace J.C. & Herráez M.P. 2003a. Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* 47:204-213.
- Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Paz P., Anel L. & Herraéz M.P. 2003b. Me₂SO influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology* 60:463-473.
- Cabrita E., Robles V., Wallace J.C., Sarasquete M.C. & Herráez M.P. 2006. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture*. 251:245–255.
- Chao N.H., Lin T.T., Chen Y.J., Hsu H.W. & Iliao.C. 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture* 155:31-44.
- Denniston R.S., Michelet S. & Godke R.A. 2000. Principles of cryopreservation. p.59-74. In: Tiersch T.R. & Mazik P.M. (Eds), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge. 1034p.
- Ding F.H., Xiao Z.Z. & Li J. 2007. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* 68:702-708.
- Dinnyés A.B., Urbányi B. & Baranyai I. 1998. Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* 50:1-13.
- Dobrinsky J.R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos, *Theriogenology* 57:285-302.

Fornari D.C. 2012. Crioconservação de embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tese de Doutorado em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 91p.

Hagedorn M., Peterson A., Mazur P. & Kleinhans F.W. 2004. High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-cooling is not an option. *Cryobiology* 49:181-189.

Holt W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:3-22.

Ibama 2008. Estatística da Pesca. 2006. Brasil: grandes regiões e unidades da Federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília. 174p.

Kusuda S., Teranishi T. & Koide N. 2002. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. *Cryobiology* 45:60-67.

Lahnsteiner F. 2008. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 69:384-396.

Lahnsteiner F. 2009. Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 72:333-340.

Liu X.H., Zhang T. & Rawson D.M. 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol. *Cryoletters* 19:309-318.

Lopes T.S., Romagosa E., Streit Jr D.P., Ribeiro R.P. & Digmayer M. 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* 75:570-576.

Lopes T.S., Streit Jr D.P., Fornari D.C., Oliveira D., Ribeiro R.P., Ribeiro R.P. & Romagosa E. 2012. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. *Zygote*, Cambridge, p.1-6.

Milone, Giuseppe. *Estatística geral e aplicada*. São Paulo: Centage Learning, 2009. Capítulo 12.

Nascimento A.F., Maria A.N., Pessoa N.O., Carvalho M.A.M. & Viveiros A.T.M. 2010. Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Anim. Reprod. Sci.* 118:324-329.

Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.

Ninhaus-Silveira A., Costa R.S., Velarde J.M.C., Senhorini J.A. & Veríssimo-Silveira R. 2012. Toxicidade de crioprotetores aos embriões de *prochilodus lineatus*. *Anais do Aquacultura*, Palmas, TO.

Olive P.J.W. & Wang W.B. 1997. Cryopreservation of *Nereis virens* (Polychaeta Annelida) larvae: the mechanism of cryopreservation of a differentiated metazoan. *Cryobiology* 34:284-294.

Robertson S.M. , Lawrence A.L. , Neill W.H. , Arnold C.R. & McCarty G. 1988. Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. *Progressive Fish-Culturist* 50:148-154.

Robles V., Cabrita E., Real M., Álvarez R. & Herráez M.P. 2003. Vitrification of turbot embryos: preliminary assay. *Cryobiology* 47:30-39.

Streit Jr, D.P., Digmayer M., Ribeiro R.P., Sirol R.N., Moraes G.V. & Galo J.M. 2007. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesq. Agropec. Bras.* 42:1199-1202.

The R Project for Statistical Computing, version 2.15. Disponível em: <http://www.r-project.org/>

Viveiros A.T.M., Nascimento A.F., Orfão L.H. & Isau Z.A. 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology* 74: 551-556.

Zhang, Y.Z.; Zhang, S.C.; Liu, X.Z.; Xu, Y.Y.; Wang, C.L.; Sawant, M.S.; Li, J.; Chen, S.L. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology* 60: 989-996.

Zhang T. & Rawson D.M. 1995. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* 32:239-246.

8 CAPÍTULO 3

THE EFFECTS OF CRYOPROTECTANTS ON CHILLED PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*) EMBRYOS AT VARIOUS ONTOGENETIC STAGES

**Nathalie Ommundsen. Pessoa ^{*1}, Ana T. M. Viveiros², Ariane Flávia do Nascimento ²,
Francisco Gerson Mendes de Souza Filho ³, Aldeney Andrade Soares Filho ⁴, Célia
Maria Souza Sampaio ¹**

¹ Dept of Biology, State University of Ceará, UECE, Fortaleza, CE, 60714-903, Brazil

² Dept of Animal Science, Federal University of Lavras, UFLA, P.O. box 3037, Lavras, MG, 37200-000,
Brazil

³ Dept of Statistics and Applied Mathematics, DEMA, Federal University of Ceará, UFC, Fortaleza,
CE, 60.455-760, Brazil

⁴ Dept of Fishery Engineering, DEP, Federal University of Ceará, UFC, Fortaleza, CE, 60.455-760, Brazil

Corresponding author: Nathalie Ommundsen Pessoa, Dept of Biology, State University of Ceará, UECE, Fortaleza, CE, 60740-000, Brazil. Phone-fax: 85 3101 9927; e-mail: nathalieop@gmail.com.

*** Corrigido e resubmetido ao periódico Aquaculture Research ISSN: 1365-2109 em 29/07/2013.**

1 ABSTRACT

Cryopreservation has not been successfully used to preserve fish embryos, although chilling techniques have been used with good results. The aim of this study was to chill *Piaractus brachypomus* embryos at different stages of development in some cryoprotectants and for various periods of chilling. Embryos at the following ontogenetic stages were used: blastoderm – 1.2 hours post-fertilization (hpf); epiboly – 5 hpf; blastopore closure – 8 hpf; and appearance of optic vesicle – 13 hpf. One hundred embryos were selected from each of the four stages and chilled in methanol, methylglycol or dimethylsulfoxide (DMSO) for 6, 8, 10 or 12 hours, at 2 °C. The total number of treatments was 4 stages x 3 cryoprotectants x 4 periods of chilling. The highest percentage of normal and live larvae (31%) was observed when embryos were chilled at 13-hpf in methanol for 6 hours. In general, larvae chilled at a more developed stages (8 and 13 hpf), in methanol and for shorter periods could survive chilling and develop normally, compared to the other treatments. Therefore, *P. brachypomus* embryos at the optical vesicle appearance stage (13 hpf) should be chilled in a solution containing 17.5% glucose and 10% methanol for up to six at 2 °C.

Keywords: Aquaculture, South American fish, embryonic stage, Larval survival

2 INTRODUCTION

Cryopreservation techniques have been successfully used since the 1970s to preserve the embryos of several species of mammals (Dobrinisky Jr, 2002) and marine invertebrates, including shellfish (Chao, Lin, Chen, Hsu & Liao 1997), sea urchins (Asahina & Takahashi 1979) and polychaetes (Olive & Wang 1997). Several studies on the cryopreservation of zebrafish embryos have also been performed (Liu, Zhang & Rawson 1998; Hagedorn, Peterson, Mazur & Kleinhans 2004). With the rapid growth of marine aquaculture, several attempts to cryopreserve other types of fish embryos have been carried out in recent years, most notably for species with large commercial value, such as *Paralichthys olivaceus* (Chen & Tian 2005; Zhang, Liu & Rawson 2003), *Scophthalmus maximus* (Cabrita, Robles, Chereguini, Wallace & Herráez 2003; Robles, Cabrita, Real, Álvarez & Herráez 2003), *Sparus aurata* (Beirao, Robles, Herraiez, Sarasquete, Dinis & Cabrita 2006; Cabrita, Robles, Wallace, Sarasquete & Herráez 2006) and *Pagrus major* (Ding, Xiao & Li 2007). These efforts, however, have yielded relatively low hatching and larval survival rates. Although efficient cryopreservation techniques for fish embryos are still lacking, chilling techniques are already being used. Recent studies have shown that *Piaractus mesopotamicus* embryos can be stored at low temperatures (-8 °C) without significantly decreasing the hatching rates (Lopes, Romagosa, Streit Jr., Ribeiro & Digmayer 2011; Lopes, Streit Jr., Fornari, de Oliveira, Ribeiro, & Romagosa 2012; Streit Jr., Digmayer, Ribeiro, Sirol, Moraes & Galo 2007).

The aforementioned chilling techniques require embryos to be placed in a cryoprotectant solution and stored at low temperatures. Studies concerning stage-dependent chilling sensitivity of fish embryos showed that post-gastrulation stage is the least sensitive to chilling injury (Dinnyes, Urbanyi, Baranyai & Magyary 1998; Hagedorn, Kleinhans, Wildt

& Rall, 1997; Liu, Chu & Lin 1993). It was found that 24-h stage of Common carp (*C. carpio* L.) embryos were stored at 4 to -2 °C in a medium containing 2.0 M methanol and 0.1 M trehalose for a period of 14 days (Ahammad Bhattacharyya & Jana (2002). Recent studies have evaluated both chilling protocols and cryoprotectant toxicity in *Prochilodus lineatus* (Costa, Velardi, Senhorini, Veríssimo-Silveira, & Silveira 2012). However, literature on the embryo chilling of freshwater tropical fish species remains scarce.

Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) is native to the Amazon and Araguaia-Tocantins basins, and it can grow to 80 cm in length and weigh up to 20 kg. This fish has scales and feeds primarily on fruits and aquatic plants, although it will also eat smaller fish. *P. brachypomus* is a very important commercial species, both as an ornamental fish and for human consumption (Val & Val-Almeida, 1995) Studies on the characterization and cryopreservation of *P. brachypomus* sperm were conducted by Nascimento, Maria, Pessoa, Carvalho & Viveiros (2012), but their embryo-chilling protocols are currently unavailable. The aim of this study was to chill *Piaractus brachypomus* embryos at 2 °C for various periods of chilling. Because the post-gastrulation stage is critical for low temperature storage the embryos were stored in a glucose solution combined with cryoprotectants.

3 MATERIALS AND METHODS

Embryo collection

This experiment was conducted between December 2011 and April 2012 at the Aquaculture Research Center (Centro de Pesquisas em Aquicultura – CPAq) of DNOCS in Pentecoste, Ceará, which is located at 03°45'00"S and 039°10'24"W and is 82 km from the state capital Fortaleza.

Fish were maintained in irtrearing ponds with a surface area of 350 m². Twenty males and 16 females of *P. brachypomum* with an average age of >3 years were tagged with chips to

avoid data loss. *P. brachypomum* viable embryos were collected from a pool of eggs originated from eight breeding pairs. Females were induced with two intramuscular injections of 0.5 and 5.0 mg/kg crude carp pituitary extract (cPE; Danúbio Aquacultura, Blumenau, Santa Catarina), within a 12-hour interval. Males were induced with a single dose of cPE at 1.0 mg kg⁻¹. The gametes were released after 280 hours-degree, and the recently fertilized eggs were transferred to 18-L conical incubators in a flow-through system. Embryo development was monitored until larval hatching, and the water temperature was maintained at 28±1°C.

Control Embryos

The control group was used to determine the influence of egg-selection and manipulation at the different ontogenetic stages. The control group was composed of four subgroups (n = 100 viable embryos), each representing one of the following stages (Lopes *et al.* 2011): Control 1: blastoderm – 1.2 hours post-fertilization (hpf) (~64 cells); Control 2: epiboly – 5 hpf (25% epiboly); Control 3: blastopore closure – 8 hpf (90% epiboly); and Control 4: appearance of optic vesicle – 13 hpf. Control embryos were incubated without the addition of cryoprotectants or chilling in 12 3-L incubators in a flow-through system until larval hatching (approximately 18 hpf).

Chilled Embryos

Viable embryos (n = 100 viable embryos/treatment) collected at those four stages (1.2, 5, 8 and 13 hpf) were placed in a Vacutainer® tube containing 17.5% glucose (Fornari, Ribeiro, Streit, Vargas, Barrero and & Moraes 2011) and one of the following cryoprotectants (10%): methanol, methylglycol or dimethylsulfoxide (DMSO). Then, tubes were transferred to a polystyrene box containing ice under constant temperature control

and chilled at a rate of approximately 0.5 °C per minute (Lopes *et al.* 2012) from 20 °C down to 2 °C for 6, 8, 10 or 12 hours. The total number of treatments was 4 stages x 3 cryoprotectants x 4 periods of chilling. The tubes were then removed from the chilling device, incubated for 5 minutes at room-temperature water and the embryos were transferred to 3-L flow-through incubators until embryonic development was completed (Fig.1).

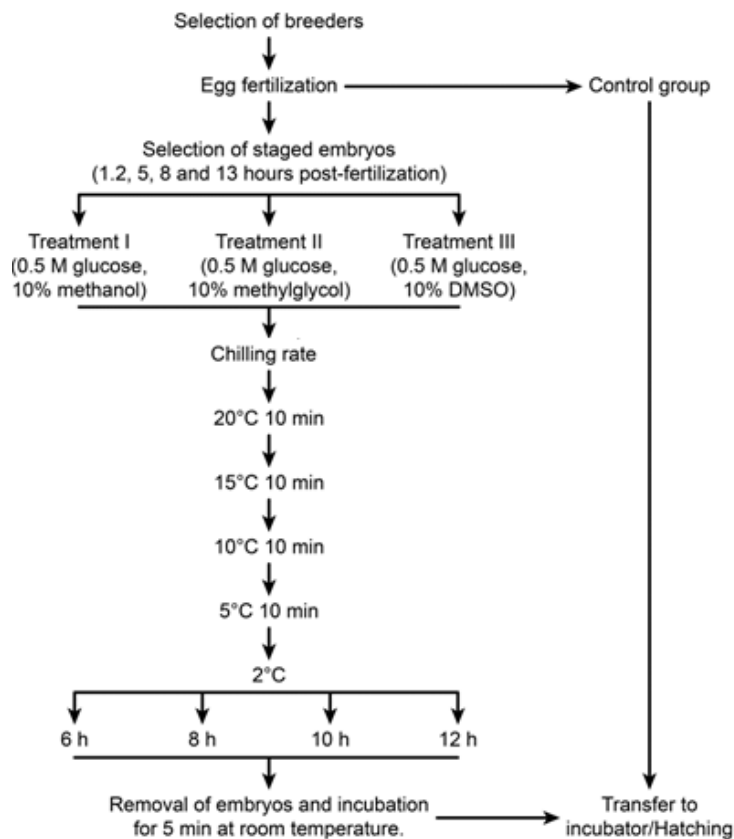


Figure 1 A flowchart showing the *P. brachypomum* embryo-chilling procedure for four embryonic stages and four storage times. Adapted from Lopes *et al.* (2011).

Post-hatching evaluation

After approximately 18 hpf, hatched larvae were removed from each incubator and the percentage of live and normal developed larvae was estimated for each of the 48 treatments.

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). When data did not fit the normal distribution, an arcsin transformation was performed. Data were tested for significant differences using ANOVA, followed by the Tukey test, when applicable. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05. All statistical analyses were performed using the R software package.

4 RESULTS

Control Study

The percentages of living larvae that developed from the control embryos selected at various ontogenetic stages are shown in Table 1

Table 1 The percentages of live control *P. brachypomum* larvae (showing complete embryonic development) that developed from embryos chosen at 1.2, 5, 8 and 13 hours post-fertilization (hpf).

Embryonic Stage	Live Larvae (%)
blastoderm – 1.2 hpf	78.2 $\pm$ 1.0
epiboly – 5 hpf	83.3 $\pm$ 1.0
blastopore closure – 8 hpf	83.4 $\pm$ 1.0
appearance of optic vesicle – 13 hpf	87.0 $\pm$ 1.0

Each mean $\pm$ standard error of the mean value represents three replicates consisting of 100 embryos each.

Chilled Embryos

In general, the larval survival rate for methanol-chilled embryos was significantly higher (31%) than the rate of methylglycol- (17%) and DMSO-chilled embryos (19%). No significant differences ($p>0.05$) were observed between the cryoprotectant groups for the 5- and 8-hpf stages; however, embryos chilled at the 13-hpf stage showed significantly higher larval survival rate (31%) compared with those treated at the other stages, regardless of cryoprotectants. Lower larval survival rates were observed for methylglycol-chilled embryos at the epiboly stage (5 hpf) (12%) and for DMSO-chilled embryos at the blastoderm stage (1.2 hpf) (5 %) (Fig. 2).

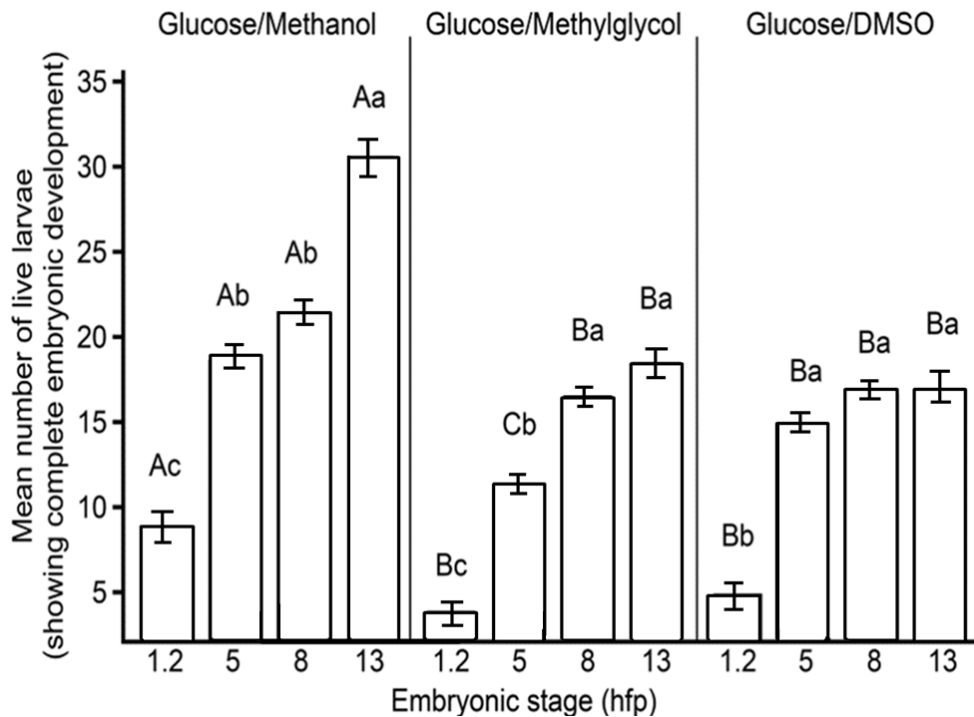


Figure 2 The percentage of live and normal *P. brachypomus* larvae originated from embryos at different ontogenic stages (from 1.2 to 13 hours post-fertilization) and chilled in glucose combined with methanol, methylglycol or DMSO for 6 to 12 hours (pooled data). Uppercase letters represent differences between cryoprotectants for the same stage and lowercase letters represent differences between stages within the same cryoprotectant. ANOVA and Tukey's test.

In methanol-chilled embryos, the percentage of live and normal larvae significantly decreased as the storage time increased, from 33% live and normal larvae after 6 hours of chilling, compared to 12 % after 12 hours. Larvae survival rate was not significantly different ($p>0.05$) between methylglycol- or DMSO-chilled embryos after 6 and 12 hour of storage. However, methylglycol-chilled embryos led to a significantly low survival rate (6%) compared with embryos chilled in the other cryoprotectants (12 %) after 8 hours of storage (Fig. 3).

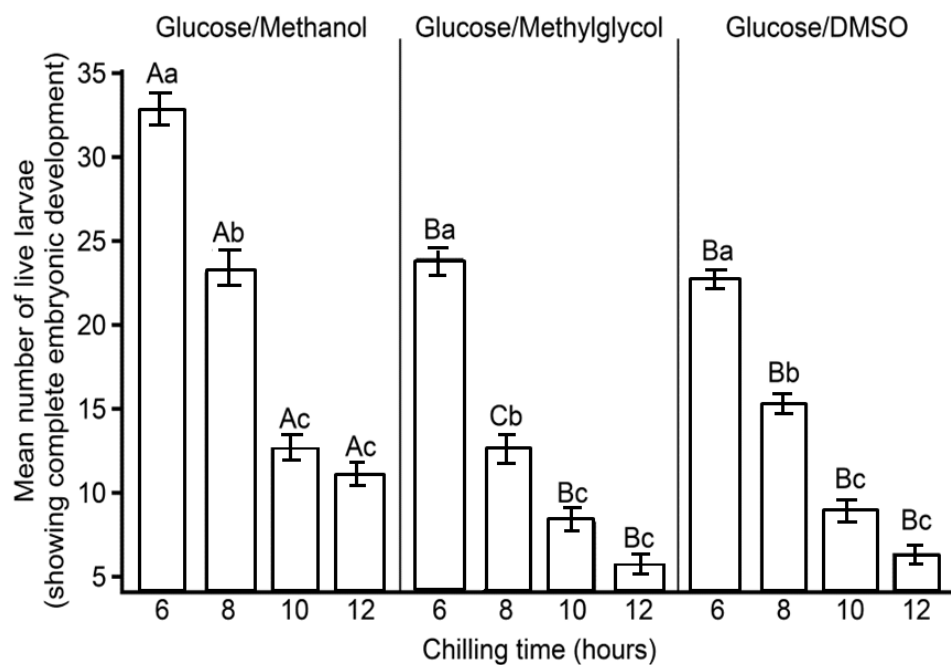


Figure 3 The percentage of live and normal *P. brachypomus* larvae originated from embryos at different ontogenic stages (pooled data) and chilled in glucose combined with methanol, methylglycol or DMSO for 6 to 12 hours post-fertilization (hpf). Uppercase letters represent differences between cryoprotectants for the same period of chilling and lowercase letters represent differences between periods of chilling within the same cryoprotectant. ANOVA and Tukey's test.

Larvae survival always decreased as the period of chilling increased, regardless of ontogenic stage or cryoprotectant (Fig. 4). Embryos chilled at the blastoderm stage (1.2

hpf), live larvae were observed after up to 8 hours of chilling at 2°C, with significantly higher larval survival rates for methanol-chilled embryos (17%); however, few live larvae were observed after 10 hours of chilling for any of the three cryoprotectants (Fig 4A) . For embryos chilled at the epiboly stage (5 hpf), the larval survival rates decreased as the chilling times increased, but live larvae were still observed after 12 hours of chilling for all three treatments except in the blastoderm stage (1,2 hpf) (Fig 4B).

For embryos chilled at the blastopore-closure stage (8 hpf), the larval survival rate for methanol-chilled embryos was significantly different (19%) from those of the other cryoprotectants after 6 hours of chilling; however, no significant differences ($p>0.05$) were observed between the treatment groups after 8, 10 or 12 hours of chilling. The mean numbers of live larvae were not significantly different ($p>0.05$) between the glucose-methylglycol and the glucose-DMSO treatment groups for any of the chilling times (Fig 4C).

For embryos chilled at the appearance-of-optic-vesicle stage (13 hpf), the methanol-chilled embryos had significant higher in the number of live larvae after 6 (47%) or 8 hours (40%) of chilling compared with the other treatments (30%); survival rates decreased for the two longest storage times (Fig 4D). At the 8-hpf stage, we observed no statistically significant differences ($p>0.05$) in the larval survival rates of embryos chilled in methylglycol or DMSO for any of the four periods of chilling.

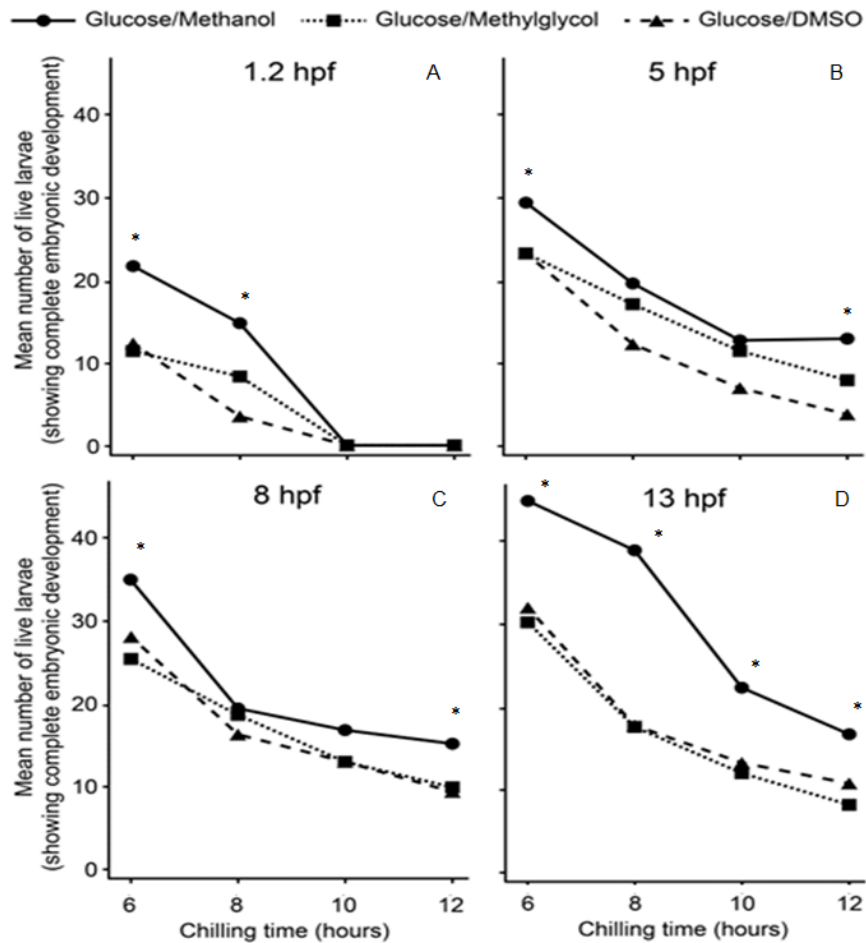


Figure 4 The mean of live and normal *P. brachyomus* larvae originated from embryos at different ontogenic stages and chilled in glucose combined with methanol, methylglycol or DMSO for 6 to 12 hours. A) Blastoderm stage (~1,2h post fertilization). B) Epiboly stage (~5 h post fertilization). C) Blastopore closure stage (~8h post fertilization). D) The appearance-of-optic-vesicle stage (~13h post fertilization).

5 DISCUSSION

In this study, it was observed the best results with respect to the number of completely developed live larvae following shorter storage times and treatment at progressively later embryonic stages, suggesting that the storage time has a strong influence on the hatching success of chilled *P. brachyomus* embryos. Differential sensitivity to chilling at different developmental stages has been reported for the embryos of many fish species, including

rainbow trout (Haga 1982; Maddock 1974), fathead minnows (Begovac & Wallace 1989), carp (Jaoul & Roubaud, 1982; Roubaud, Chaillou & Sjafai 1985), zebrafish (Hagedorn et al. 1997; Zhang & Rawson, 1995) and goldfish (Liu et al. 1993). The majority of these studies show that post-gastrulation embryos are less sensitive to cold-induced damage. This is consistent with our findings, and indeed, it was observed the best results when *P. brachypomus* embryos were chilled at an even more advanced developmental stage, namely, after the appearance of the optic vesicle (13 hpf). This phenomenon is likely due to the fact that early-stage embryos are more susceptible to cytotoxicity (Bart 2000), as their metabolic regulatory pathways are not well developed at these stages, making them unable to compensate for the toxicity of the cryoprotectants (Lahnsteiner 2008).

Of the cryoprotectants tested, methanol resulted in higher larval survival rates compared with glucose-methylglycol or glucose-DMSO. Furthermore, the chilling of *P. mesopotamicus* embryos with methylglycol (Streit Jr. et al. 2007) led to lower hatching rates. It is possible that methylglycol may significantly interfere with embryonic metabolism, leading to cellular breakdown and, consequently, embryonic death.

In this study, there was no satisfactory result when chilling *P. brachypomus* embryos in DMSO. In contrast, methanol and DMSO were less toxic for red drum (*Sciaenops ocellatus*) embryos compared to glycerol, methylglycol, sucrose and sea salt (Robertson, Lawrence, Neill, Arnold & McCarthy 1988). However, for other embryos, such as turbot (*Scophthalmus maximus*), DMSO appears to be less toxic than methanol or methylglycol (Cabrita et al. 2003). Furthermore, the toxicity of specific cryoprotectants may be affected by the embryonic stage at the time of treatment. DMSO was less toxic than methanol during the morula and segmentation stages in carp (*C. carpio*) embryos, whereas methanol was less toxic than DMSO after the initiation of heart beating (Dinnyés et al. 1998).

Methanol penetrates cells significantly faster than DMSO or glycerol in salmonid embryos (Harvey & Ashwood-Smith 1982). The superior penetrative ability of methanol is primarily due to its low molecular weight, which is one of the most desirable characteristics for an embryonic cryoprotectant. These findings are consistent with those of Zhang, Rawson & Morris (1993), who observed that methanol rapidly penetrates the chorion of zebrafish embryos. Additionally higher hatching rates were observed in zebrafish embryos treated with methanol compared with embryos treated with DMSO or methylglycol (Zhang et al. 1993). In more recent studies on *Piaractus mesopotamicus* and *Prochilodus lineatus* embryos, better results were obtained using combinations of methanol and sucrose prior to embryo storage at negative temperatures (Lopes et al. 2011; Lopes et al. 2012; Costa et al. 2012).

Of the cryoprotectants used in this study, DMSO and methyl glycol have similar molecular masses (~78 and 76 g-mol, respectively), whereas the molecular mass of methanol is less than half of those values (32.04 g-mol). Therefore, in the context of embryonic chilling, differences between DMSO and methylglycol are unlikely to be due to differences in molecular size. However, due to its small size, methanol is significantly more permeant, and its effects should be tested at other concentrations to better understand its cryoprotective properties (Xiao, Zhang, Xu, Liu, Li, Ma, Xu, Xue & Xue 2008).

Therefore, *P. brachypomus* embryos should be chilled at the optic vesicle appearance stage (13-hpf) in a solution containing 17.5% glucose and 10% methanol for up to 6 hours at 2°C. This is the first report on the successful chilling of *P. brachypomus* embryos. Despite of these promising results, many variables remain to be addressed in future studies, such as factors that affect chilling damage, embryonic permeability and osmoregulation, as well as the effectiveness of other cryoprotectants.

6 ACKNOWLEDGMENTS

We thank DNOCS for providing the broodstock and the Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) for the economic support.

7 REFERENCES

Ahammad M.M., Bhattacharyya D. & Jana B.B. (2002) The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology* **44**, 114–121.

Ahammad M.M., Bhattacharyya D. & Jana B.B. (2003) Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* **46**, 1–16.

Asahina E. & Takahashi T. (1979) Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm. *Development, Growth & Differentiation* **21**, 423–430.

Bart A. (2000) New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: *Cryopreservation in aquatic species* (ed by Tiersch T.R., Mazik P.M.), pp. 179–187. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Begovac P.C. & Wallace R.C. (1989) Major vitelline envelope proteins in piperfish oocytes originate within the follicle and are associated with the Z3 layer. *Journal of Experimental Zoology* **251**, 56–73.

Beirao J., Robles V., Herraiz M.P., Sarasquete C., Dinis M.T. & Cabrita E. (2006) Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* **261**, 897–903.

Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Wallace J.C. & Herráez M.P. (2003) Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* **47**, 204–213.

Cabrita E., Robles V., Wallace J.C., Sarasquete M.C. & Herráez M.P. (2006) Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* **251**, 245–255.

Chao N.H., Lin T.T., Chen Y.J., Hsu H.W. & Liao I. C.(1997) Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture* **155**, 31–44.

Chen S.L. & Tian Y.S. (2005) Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* **63**, 1207–1219.

Costa R.S., Velardi J.M.C., Senhorini J.A., Veríssimo-Silveira R. & Silveira A.N. (2012) Resfriamento de embriões de peixes neotropicais [Chilling of Neotropical fish embryos]. *Proceedings of Aquaciência* Palmas, Brazil.

Ding F.H., Xiao Z.Z. & Li J. (2007) Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* **68**, 702–708.

Dinnyés A.B., Urbányi B. & Baranyai I. (1998) Magyary Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* **50**, 1–13.

Dobrinsky J.R. (2002) Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* **57**, 285–302.

Haga Y. (1982) On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* **48**, 1569–1572.

Fornari D. C., Ribeiro R.P., Streit D.P., Vargas L., Barrero N.M.L. & Moraes G.V. (2011) Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote*, **19**, 345- 350.

Hagedorn M., Kleinhans F.W., Freitas R., Liu J., Hsu E.W., Wildt D.E. & Rall W.F. (1997) Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Zoology* **278**, 356–371.

Hagedorn M., Peterson A., Mazur P., Kleinhans F.W. (2004) High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-cooling is not an option. *Cryobiology* **49**, 181–189.

Harvey B. (1983) Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms, and intact embryos of the zebra fish *Brachydanio rerio* to minus -196°C. *Cryobiology* **20**, 440–447.

Harvey B. & Ashwood-Smith M.J. (1982) Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of Salmonid fish. *Cryobiology* **19**, 29–40.

Holt. W.V. (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**, 3–22.

Jaoul A. & Roubaud P. (1982) Resistance de l'oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. *Canadian Journal of Zoology* **60**, 3409–3419.

Lahnsteiner F. (2008) The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* **69**, 384–396.

Leibo S.P. (2000) Sources of variation in cryopreservation. In: *Cryopreservation in aquatic species*. (ed by Tiersch T.R., Mazik P.M.), pp. 75–83. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Liu K., Chou T. & Lin H. (1993) Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. *Aquatic Living Resources* **6**, 145–153.

Liu X.H., Zhang T. & Rawson D.M. (1998) Feasibility of vitrification of zebrafish embryos using methanol. *Cryoletters* **19**, 309–318.

Lopes T.S., Romagosa E., Streit Jr. D.P., Ribeiro R.P. & Digmayer M., 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* **75**, 570–576.

Lopes T.S., Streit Jr. D.P., Fornari D.C., de Oliveira D., Ribeiro, R.P. & Romagosa E. (2012) Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. *Zygote* 1-6.

Maddock B.G. (1974) A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. *Progressive Fish-Culturist* **36**, 219–222.

Nascimento A.F., Maria A.N., Pessoa N.O., Carvalho M.A.M. & Viveiros A.T. (2010) Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science* **118**, 324–329.

Ninhaus-Silveira A., Costa R.S., Velarde J.M.C., Senhorini J.A. & Veríssimo-Silveira R. (2012) Toxicidade de crioprotetores aos embriões de *Prochilodus lineatus* [Cryoprotectant toxicity in *Prochilodus lineatus* embryos]. *Proceedings of Aquaciência* Palmas, Brazil.

Olive P.J.W. & Wang W.B. (1997) Cryopreservation of *Nereis virens* (polychaeta Annelida) larvae: the mechanism of cryopreservation of a differentiated metazoan. *Cryobiology* **34**, 284–294.

Robertson S.M., Lawrence A.L., Neill W.H., Arnold C.R. & McCarthy G. (1988) Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. *Progressive Fish-Culturist* **50**, 148–154.

Robles V., Cabrita E., Real M., Álvarez R & Herráez M.P. (2003) Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* **47**, 30–39.

Roubaud P., Chaillou C. & Sjafei D. (1985) Variations cycliques de la tolerance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de l'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *Canadian Journal of Zoology* **63**, 657–663.

Streit Jr. D.P., Digmayer M., Ribeiro R.P., Sirol R.N., Moraes G.V. & Galo J.M. (2007) Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento [Pacu embryos submitted to different cooling protocols]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 1199–1202.

Tomita F.I., Gonçalves L.U., Araújo A.H., Fornari D.C. & Viegas E.M. (2008) Desenvolvimento embrionário de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) [The embryonic development of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)]. *Proceedings of Aquaciência Maringá, Brazil*.

Val, A. L.; Val-Almeida, V. M. F. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects. Springer Heidelberg, 1995, 224p.

Xiao Z.Z., Zhang L.L., Xu X.Z., Liu Q.H., Li J., Ma D.Y., Xu S.H., Xue Y.P. & Xue Q.Z. (2008) Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* **70**, 1086–1092.

Zhang T., Liu X.Z. & Rawson D.M. (2003) Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Theriogenology* **59**, 1545–1556.

Zhang T. & Rawson D.M. (1995) Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* **32**, 239–246.

Zhang T., Rawson D.M. & Morris G.J. (1993) Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Aquatic Living Resources* **6**, 145–153.

Zhang Y.Z., Zhang S.C., Liu X.Z., Xu. Y.J., Hu J.H., Xu Y.Y., Li J. & Chen S.L., (2005) Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology* **63**, 763–773.

9 CAPÍTULO 4

COOLING OF PIRAPITINGA (*Piaractus brachypomus*) EMBRYOS STORED AT -10°C

Nathalie Ommundsen Pessoa ^{*1}, José Agenor Soares Galvão ¹, Francisco Gerson Mendes de Souza Filho ², Míriam Luiza Nogueira Martins de Sousa ¹, Célia Maria Souza Sampaio ¹

¹ Dept of Biology, State University of Ceará, UECE, Fortaleza, CE, 60740-000, Brazil

² Dept of Statistics and Applied Mathematics, DEMA, Federal University of Ceará, UFC, Fortaleza, CE, 60.455-760, Brazil

*Corresponding author: Nathalie Ommundsen Pessoa, Dept of Biology, State University of Ceará, UECE, Fortaleza, CE, 60714-903, Brazil. Phone-fax: 85 3101 9927; e-mail: nathalieop@gmail.com.

*** Artigo aceito no periódico Zygote (ISSN: 0967-1994) em 06/01/2014.**

ABSTRACT

Cryopreservation has not been successfully used to preserve fish embryos, although chilling techniques have been used with good results. The aim of this study was to chill *Piaractus brachipomus* embryos at -10 °C for various storage times. Embryos at the following ontogenetic stages were used: blastoderm – 1.2 hours post-fertilization (hpf); epiboly – 5 hpf; blastopore closure – 8 hpf; and appearance of optic vesicle – 13 hpf. One hundred embryos were selected from each ontogenetic stage and chilled at -10 °C for 6 or 10 hours. The results were analyzed using ANOVA and Tukey's test at a 5% significance level. A significant greater number of completely developed live larvae following embryonic treatment with a cryoprotectant solution containing 17.5% sucrose and 10% methanol were observed. There was no survival embryos cooling at -10 °C in initial developmental stages (1,2 and 5 h-hpf). Furthermore, higher survival rates were observed when embryos were treated at more advanced developmental stages (8 and 13 hpf). Therefore, *P. brachypomus* embryos at the blastopore-closure (8 hpf) or appearance-of-optic-vesicle (13 hpf) stages should be used for embryo chilling protocols and that chilling should be performed using a 17.5% sucrose with 10% methanol solution at -10 °C for up to six hours. The best results were obtained with 13-hpf and 8-hpf embryos cooling at 6 hours of storage.

Keywords: Aquaculture, South American fish, Embryonic stage, Fresh water fish, Larval survival

INTRODUCTION

It has been known for many decades that development of fish embryos is influenced by temperature. Within the tolerance levels, low temperature slows down and high temperature accelerates development. Chilling of fish embryos has gathered attention, as it is a way to arrest development and to store embryos in a specific differentiation stage for extended time periods. With the rapid growth of marine aquaculture, several attempts to cryopreserve other types of fish embryos have been carried out in recent years, most notably for species with large commercial value, such as *Paralichthys olivaceus* (Chen & Tian, 2005; Zhang *et al.*, 2003), *Scophthalmus maximus* (Cabrita *et al.*, 2003; Robles *et al.*, 2003), *Sparus aurata* (Beirao *et al.*, 2006; Cabrita *et al.*, 2006) and *Pagrus major* (Ding *et al.*, 2007). Several studies have been performed on the chilled storage of fish embryos: In the vendace (*Coregonus albula*), hatching of embryos can be delayed for several weeks by cooling to 1 to 2 °C (Luczynski, 1984). When conditions for hatching are optimal, the incubation temperature is raised, and mass hatching of normally developed larvae occurs within 2 to 3 days (Luczynski, 1984). In the brown trout (*Salmo trutta*), embryo development can be extended for up to 4 months at 1.4°C (Maddock, 1974).

The cooling technique consists of submitting cryoprotected fish embryos at sub-zero temperatures followed by short storage periods, resulting in a decrease in enzymatic and cellular activity (Ahammad *et al.*, 2003). This biotechnological method allows several practical applications such as: transportation of embryos obtained from remote areas (Ahammad *et al.*, 2003); synchronising the development of embryos collected from different spawning events (Lahnsteiner, 2008); and optimises the use of hatchery facilities (Streit Jr. *et al.*, 2007).

These efforts, however, have yielded relatively low hatching and larval survival rates. Although efficient cryopreservation techniques for fish embryos are still lacking, chilling techniques are already being used. Recent studies have shown that *Piaractus mesopotamicus* embryos can be stored at low temperatures without significantly decreasing the hatching rates (Lopes *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012; Streit Jr. *et al.*, 2007).

Recent studies have evaluated both chilling protocols and cryoprotectant toxicity in *Prochilus lineatus* (Costa *et al.*, 2012; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2012). However, literature on the chilling of freshwater tropical fish species remains scarce.

Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) is native to the Amazon and Araguaia-Tocantins basins, and it can grow to 80 cm in length and weigh up to 20 kg. This fish has scales and feeds primarily on fruits and aquatic plants, although it will also eat smaller fish. *P. brachypomus* is a very important commercial species, both as an ornamental fish and for human consumption (Val & Val-Almeida, 1995). Studies on the characterization and cryopreservation of *P. brachypomus* sperm were conducted by Nascimento *et al.* (2010), but their embryo-chilling protocols are currently unavailable.

The aim of this study was to chill *Piaractus brachypomus* embryos at -10 °C for two storage times. Because the post-gastrulation stage is critical for low temperature storage as well as for cryopreservation (Ahammad *et al.*, 2002), the embryos were treated in solution with glucose 17,5% ; sucrose 17,5% or tap water and internal cryoprotector methanol 10%.

MATERIALS AND METHODS

Embryo collection

This experiment was conducted between December 2012 and April 2013 at the Aquaculture Research Center (Centro de Pesquisas em Aquicultura – CPAq) of DNOCS in Pentecoste, Ceará, which is located at 03°45'00"S and 039°10'24"W and is 82 km from the state capital Fortaleza.

Fish were maintained in irtrearing ponds with a surface area of 350 m². Twenty males and 16 females of *P. brachypomum* with an average age of >3 years were tagged with chips to avoid data loss.

P. brachypomum embryos were collected from a pool of eggs originated from eight best breeding pairs. Females were induced with two intramuscular injections of 0.5 and 5.0 mg/kg crude carp pituitary extract (cPE; Danúbio Aquacultura, Blumenau, Santa Catarina), within a 12-hour

interval. Males were induced with a single dose of cPE at 1.0 mg kg^{-1} . The gametes were released after 280 hours-degree, and the recently fertilized eggs were transferred to 18-L conical incubators in a flow-through system. Embryo development was monitored until larval hatching, and the water temperature was maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Viable eggs were divided into control and treatment groups for each of the four storage times. Each experimental unit consisted of 100 viable embryos. There were three replicates for the control group and six replicates for each treatment group. The treatment groups were divided into two completely randomized blocks: the first block was based on embryonic stage, and the second was based on the chilling time.

Control group

The control group was used to determine the influence of the egg-selection process on the hatching rate for different ontogenetic stages in the absence of chilling. The control group was composed of four subgroups, each representing one of the following embryonic stages (Lopes *et al.*, 2011): Control 1: blastoderm – 1.2 hours post-fertilization (hpf) (~64 cells); Control 2: epiboly – 5 hpf (25% epiboly); Control 3: blastopore closure – 8 hpf (90% epiboly); and Control 4: appearance of optic vesicle – 13 hpf. Control embryos were incubated without cryoprotectant in 12 3-L incubators in a flow-through system until larval hatching (approximately 18 hpf).

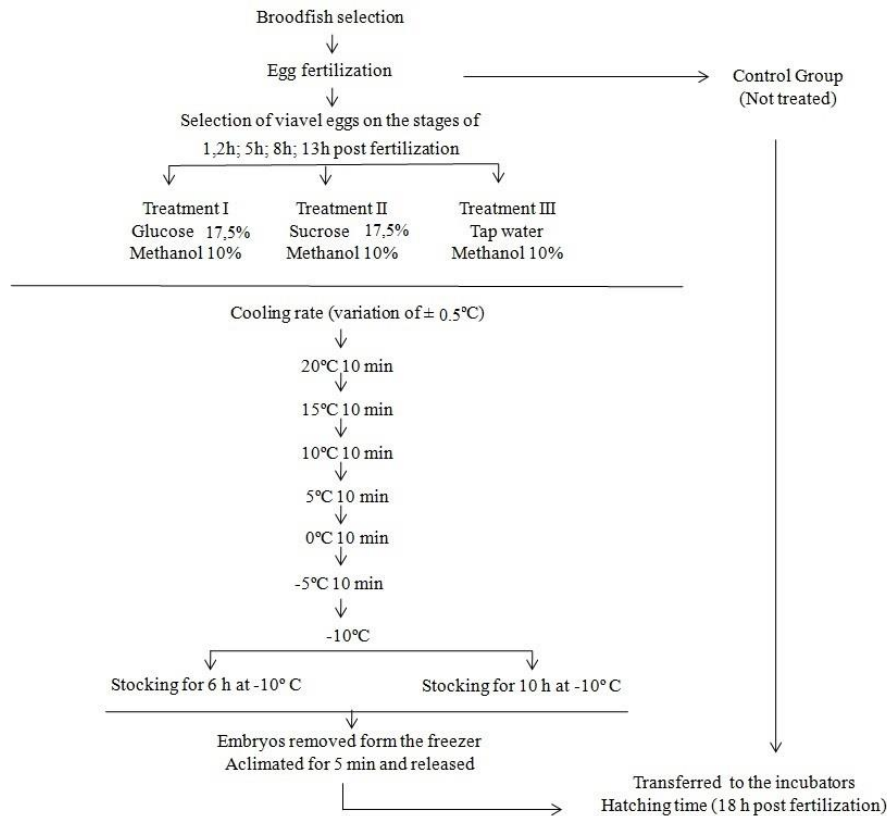


Figure 1 A flowchart showing the *P. brachypomum* embryo-chilling procedure for four embryonic stages and four storage times. Adapted from Lopes et al. (2011).

Embryos used for the chilling experiments

The treatment groups consisted of viable embryos collected at various embryonic stages (1.2, 5, 8 and 13 hpf). Each group was placed in a Vacutainer® tube containing a solution composed of 17.5% glucose or 17.5% sucrose (Fornari *et al.*, 2011) or tap water and the following cryoprotectants (10%) methanol. Then, tubes were transferred to a polystyrene box containing ice under constant temperature control, chilled at a rate of approximately 1°C per minute (Lopes *et al.* 2012) from 20 °C down to -10 °C for 6 or 10 hours. The tubes were then removed from the chilling device, incubated for 5 minutes at room-temperature water and transferred to 3-L incubators. Those embryos were placed in an incubator with continuous water flow until embryonic development was complete (Fig.1).

Evaluation of larval survival rate

After embryonic development was complete (approximately 18 hpf), both control and treated embryos were removed from the incubators to estimate the number of live larvae that had completed development. The total numbers of live larvae that had developed from the treated embryos per hour of chilling were determined for each ontogenetic stage. The effects of the treatments for each chilling time were also determined for each ontogenetic stage.

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals.

Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). When data did not fit the normal distribution, an arcsin transformation was performed. Data were tested for significant differences using ANOVA, followed by the HSD Tukey test, when applicable. The level of significance for all statistical tests was set at 0.05. All statistical analyses were performed using the R software package.

RESULTS

Control Study

The percentages of living larvae that developed from the control embryos selected at various ontogenetic stages are shown in Table 1.

Table 1 The percentages of live control *P. brachypomum* larvae (showing complete embryonic development) that developed from embryos chosen at 1.2, 5, 8 and 13 hours post-fertilization (hpf).

Embryonic Stage	Live Larvae (%)
blastoderm – 1.2 hpf	78.2 ± 1.0
epiboly – 5 hpf	83.3 ± 1.0
blastopore closure – 8 hpf	83.4 ± 1.0
appearance of optic vesicle – 13 hpf	87.0 ± 1.0

Each mean±standard error of the mean value represents three replicates consisting of 100 embryos each.

The effects of chilling time on embryonic development

The larval survival rate for embryos chilled in a sucrose-methanol solution was significantly higher ($p \leq 0.05$) than the rate for embryos treated with glucose- methanol or water-methanol solutions (Fig. 2).

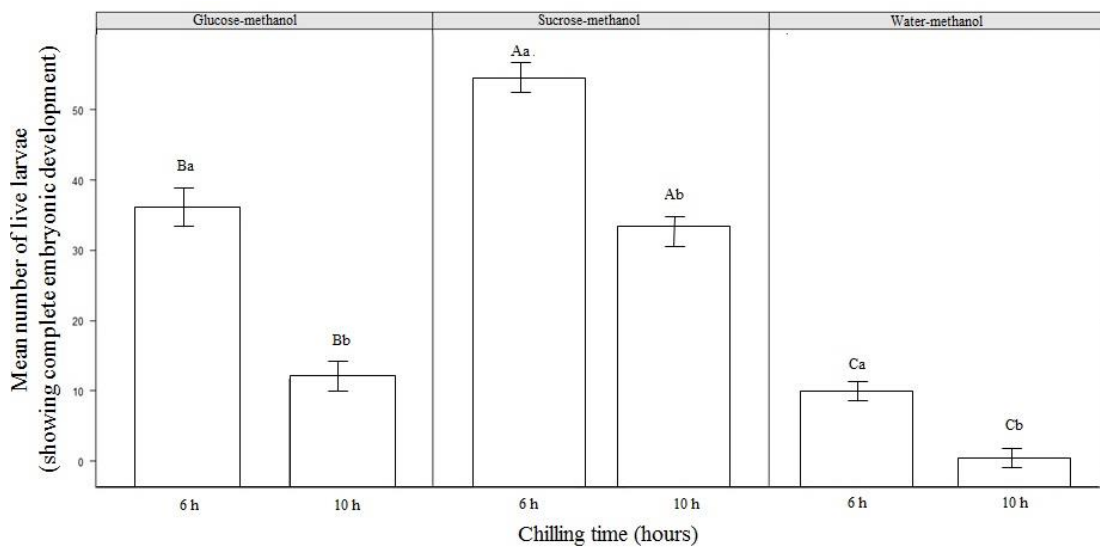


Figure 2 The mean numbers of live *P. brachypomus* larvae (showing complete embryonic development) following embryonic treatment with different cryoprotectant solutions and chilling for two storage times. Uppercase letters represent differences between treatments for the same hours and lowercase letters represent differences within the treatment.

In embryos incubated in sucrose-methanol, the number of live larvae decreased significantly ($p \leq 0.05$) as the storage time increased, with the highest mean observed for embryos chilled for 6 hours. Larval survival was significantly different ($p > 0.05$) between embryos chilled in glucose-methanol compared with water-methanol for the 6- and 10-hour storage. However, embryos chilled in water-methanol led to a significantly lower survival rate ($p \leq 0.05$) compared with embryos chilled in the other cryoprotectants when the embryos were chilled for 10 hours.

The effects of chilling treatment at different ontogenetic stages

There was no survival embryos at stages blastoderm (~1,2 hours pos fertilization-hpf) and epobily (~5 hpf) in any treatment, only embryos at the stage blastopore closure (~8 hpf) and appearance of optic vesicle (~13hpf) was alive at the end of experiment.

The embryos treated with the sucrose-methanol solution had statistically higher ($p \leq 0.05$) larval survival rates compared with the other treatments. Embryos chilling at stage 13 hpf with sucrose-methanol had statistically higher ($p \leq 0.05$) larval survival rates compared with embryos in the same treatment at stage 8 hpf.(Fig 3).

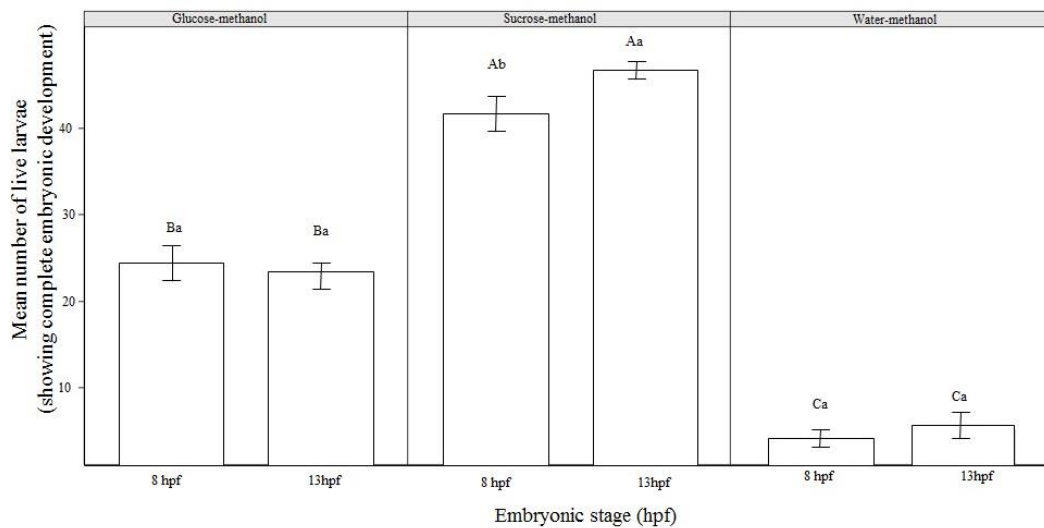


Figure 3 The mean numbers of live *P. brachypomus* larvae (showing complete embryonic development) developing from embryos treated with sucrose-methanol, glucose-methanol or water-methanol solutions at various ontogenetic stages. Uppercase letters represent differences between treatments for the same stages and lowercase letters represent differences within the treatment.

Significant differences ($p>0.05$) were observed in the larval survival rates between the glucose-methanol and water-methanol treatment groups. Embryos treated with the glucose methanol had statistically higher ($p\leq0.05$) larval survival rates compared with water-methanol. Furthermore, no significant differences ($p>0.05$) were observed between the 8-hpf and 13-hpf stages treated with glucose-methanol or between the 8-hpf and 13-hpf stages treated with water-methanol (Fig 3).

The combined effects of treatment, storage time and developmental stage

It was observed that the mean numbers of completely developed live larvae decreased as the storage time at -10°C increased (Fig. 2). For embryos treated at the appearance of optic vesicle stage ($\sim 13\text{hpf}$), live larvae were observed after up to 10 hours of chilling at -10°C , with significantly ($p\leq0.05$) higher larval survival rates for embryos treated with the sucrose-methanol solution. However, few live larvae were observed after 10 hours of chilling for glucose-methanol or water-methanol.

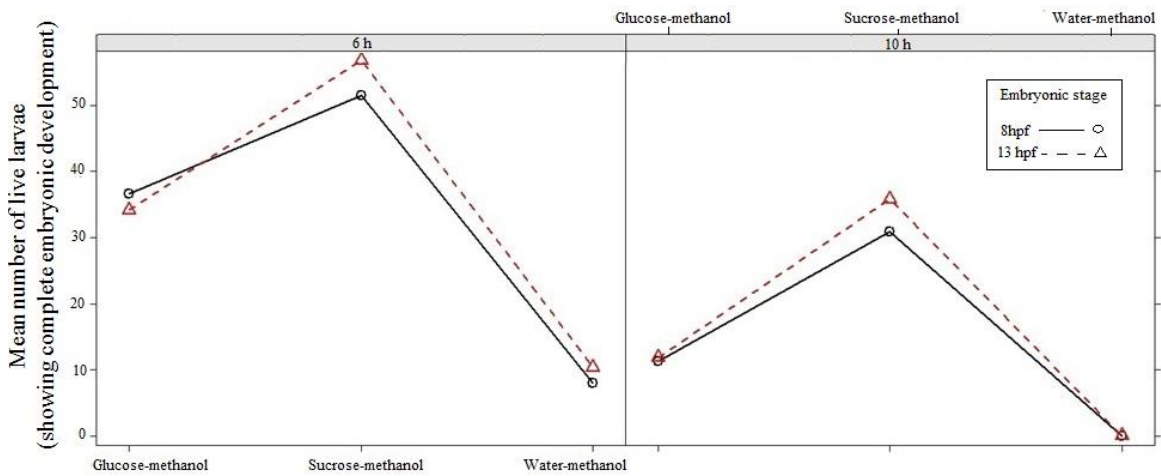


Figure 4 The mean numbers of live *P. brachypomus* larvae (showing complete embryonic development) developing from embryos treated with cryoprotectant solutions at various ontogenetic stages for various chilling times (6 or 10 hours).

For embryos treated at the blastopore-closure stage (8 hpf) and the appearance of optic vesicle stage ($\sim 13\text{hpf}$), the larval survival rate for the sucrose-methanol group was significantly different ($p\leq0.05$) from those of the other treatment groups after 6 and 10 hours of chilling. Larval survival

rates as the storage times increased (Fig. 4). The mean numbers of live larvae decreased significantly ($p>0.05$) in the treatment glucose-methanol when compared 6 hours to 10 hours of storage time,.

For embryos treated at the appearance-of-optic-vesicle stage (13 hpf), the sucrose-methanol treatment had significant higher in the number of live larvae after 6 or 10 hours of chilling compared with the other treatments ($p\leq 0.05$); survival rates decreased for the two storage times (Fig. 4). At the 8-hpf and 13-hpf stages, there was observed no statistically significant differences ($p>0.05$) in the larval survival rates of embryos treated with water-methanol for any of the two chilling times.

DISCUSSION

There was no survival chilling embryos at initial ontogenic stages (1,2 hpf and 5 hpf) after storage at -10°C . According to Zhang *et al.* (2003), the ontogenetic process can fail, thereby rendering cryopreservation unviable. Similarly, Zhang & Rawson (1995) reported this occurred with initial stages of *Danio rerio* embryos. The *P. brachypomus* used in the present study could have greater susceptibility to cooling, due to high lipid concentrations, which may have affected cryoprotectant action. Furthermore, initial stages of embryonic development are more susceptible to the toxic effects of cryoprotectants (Bart, 2000), as regulatory metabolic pathways are not fully developed (Lahnsteiner, 2008). In general, cold sensitivity is related to mechanisms for repairing cells and tissues (Dinnyes *et al.*, 1998) therefore, the more complex the cell, the less likely they are to react in the same way when exposed to cold.

In this study, it was observed the best results with respect to the number of completely developed live larvae following shorter storage times and treatment at progressively later embryonic stages, suggesting that the storage time has a strong influence on the hatching success of chilled *P. brachypomus* embryos. Intermediary embryonic stages of *P. brachypomus* (8 and 13 hpf) were more resistant both to injuries caused by cold and to toxicity caused by cryoprotectants. Differential sensitivity to chilling at different developmental stages has been reported for the

embryos of many fish species, including rainbow trout (Haga, 1982; Maddock, 1974), fathead minnows (Begovac & Wallace, 1989), carp (Jaoul & Roubaud, 1982; Roubaud *et al.*, 1985), zebrafish (Hagedorn *et al.*, 1997; Zhang & Rawson, 1995) and goldfish (Liu *et al.*, 1993). The majority of these studies show that post-gastrulation embryos are less sensitive to cold-induced damage. This is consistent with our findings, and indeed, it was observed the best results when *P. brachypomus* embryos were chilled at an even more advanced developmental stage, namely, after the appearance of the optic vesicle (13 hpf). This phenomenon is likely due to the fact that early-stage embryos are more susceptible to cytotoxicity (Bart, 2000), as their metabolic regulatory pathways are not well developed at these stages, making them unable to compensate for the toxicity of the cryoprotectants (Lahnsteiner, 2008).

Of the tested cryoprotectants, a combination of sucrose and methanol resulted in higher larval survival rates compared with combinations of glucose and methanol or tap water and methanol. In more recent studies on *Piaractus mesopotamicus* and *Prochilodus lineatus* embryos, good results were obtained using combinations of 17,5% sucrose and methanol prior to embryo storage at negative temperatures (Fornari *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012; Ninhaus-Silveira *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2012).

When testing the cryoprotective effects of methanol, glycerol, DMSO, methylglycol, sucrose and sea salt, Robertson *et al.* (1988) found that methanol and DMSO had the lowest toxicity levels towards red drum (*Sciaenops ocellatus*) embryos. Furthermore, the toxicity of specific cryoprotectants may be affected by the embryonic stage at the time of treatment. Indeed, Dinnyés *et al.* (1998) showed in carp (*C. carpio*) that DMSO was less toxic than methanol during the morula and segmentation stages, whereas methanol was less toxic than DMSO after the initiation of heart beating.

A study by Harvey & Ashwood-Smith (1982) reported that methanol penetrates cells significantly faster than others cryoprotectants (DMSO or glycerol) in salmonid embryos. The superior penetrative ability of methanol is primarily due to its low molecular weight, which is one of the

most desirable characteristics for an embryonic cryoprotectant. These findings are consistent with those of Zhang *et al.* (1993), who observed that methanol rapidly penetrates the chorion of zebrafish embryos. Additionally, Zhang *et al.* (1993), observed in zebrafish with higher hatching rates in embryos treated with methanol compared with embryos treated with DMSO or methylglycol.

Therefore, in conclusion, *P. brachypomus* embryos at the blastopore-closure (8-hpf) or appearance-of-optic-vesicle (13-hpf) stages are best for use with chilling protocols and that they can be maintained with better results in a 17.5% sucrose-10% methanol solution for up to 6 hours at -10 °C. The best results of live larvae were obtained storing 13-hpf embryos for 6 hours. This is the first report on the chilling at below-freezing of *P. brachypomus* embryos. Despite these promising results, many variables remain to be addressed in future studies, including factors that affect chilling damage, embryonic permeability and osmoregulation, as well as the effectiveness of other extracellular cryoprotectants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank DNOCS for providing the broodstock and the Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) for the economic support.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Ahammad M.M., Bhattacharyya D. & Jana B.B. (2002) The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology* **44**, 114–121
- Ahammad M.M., Bhattacharyya D. & Jana B.B. (2003) Stage-dependent hatching responses of rohu (*Labeo rohita*) embryos to different concentrations of cryoprotectants and temperatures. *Cryobiology* **46**, 1–16.

- Bart A. (2000) New approaches in cryopreservation of fish embryos. In: Cryopreservation in aquatic species (ed by Tiersch T.R., Mazik P.M.), World Aquaculture Society, Baton Rouge. pp. 179–187.
- Begovac P.C. & Wallace R.C. (1989) Major vitelline envelope proteins in piperfish oocytes originate within the follicle and are associated with the Z3 layer. *Journal of Experimental Zoology* **251**, 56–73.
- Beirao J., Robles V., Herraéz M.P., Sarasquete C., Dinis M.T. & Cabrita E. (2006) Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* **261**, 897–903.
- Cabrita E., Robles V., Chereguini O., Wallace J.C. & Herráez M.P. (2003) Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Cryobiology* **47**, 204–213.
- Cabrita E., Robles V., Wallace J.C., Sarasquete M.C. & Herráez M.P. (2006) Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture* **251**, 245–255.
- Chen S.L. & Tian Y.S. (2005) Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology* **63**, 1207–1219.
- Costa R.S., Velardi J.M.C., Senhorini J.A., Veríssimo-Silveira R. & Silveira A.N. (2012) Resfriamento de embriões de peixes neotropicais [Chilling of Neotropical fish embryos]. Proceedings of Aquaciência, Palmas, Brazil.
- Ding F.H., Xiao Z.Z. & Li J. (2007) Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology* **68**, 702–708.

- Dinnyés A.B., Urbányi B. & Baranyai I. Magyary (1998) Chilling sensitivity of carp (*Cyprinus carpio*) embryos at different developmental stages in the presence or absence of cryoprotectants: work in progress. *Theriogenology* **50**, 1–13.
- Fornari D. C., Ribeiro R.P., Streit D.P., Vargas L., Barrero N.M.L. & Moraes G.V. (2011) Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote* **19**, 345–350.
- Haga Y. (1982) On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* **48**, 1569–1572.
- Hagedorn M., Kleinhans F.W., Freitas R., Liu J., Hsu E.W., Wildt D.E. & Rall W.F. (1997) Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Zoology* **278**, 356–371.
- Harvey B. & Ashwood-Smith M.J. (1982) Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of Salmonid fish. *Cryobiology* **19**, 29–40.
- Holt. W.V. (2000) Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**, 3–22.
- Jaoul A. & Roubaud P. (1982) Resistance de l'oeuf de carp commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) a des chocs thermiques chauds ou froids. *Canadian Journal of Zoology* **60**, 3409–3419.
- Lahnsteiner F. (2008) The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* **69**, 384–396.
- Liu K., Chou T. & Lin H. (1993) Cryosurvival of goldfish embryos after subzero freezing. *Aquatic Living Resources* **6**, 145–153.

Lopes T.S., Romagosa E., Streit Jr. D.P., Ribeiro R.P. & Digmayer M., 2011. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours. *Theriogenology* **75**, 570–576.

Lopes T.S., Streit Jr. D.P., Fornari D.C., de Oliveira D., Ribeiro, R.P. & Romagosa E. (2012) Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. *Zygote* **1-6**.

Luczynski M. (1984) A technique for delaying embryogenesis of vendace (*Coregonus albula* L.) eggs in order to synchronize mass hatching with optimal conditions for lake stocking. *Aquaculture* **41**, 113–7.

Maddock B.G. (1974) A technique to prolong the incubation period of brown trout ova. *Progressive Fish-Culturist* **36**, 219–222.

Nascimento A.F., Maria A.N., Pessoa N.O., Carvalho M.A.M. & Viveiros A.T. (2010) Out-of-season sperm cryopreserved in different media of the Amazonian freshwater fish pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). *Animal Reproduction Science* **118**, 324–329.

Ninhaus-Silveira A., Costa R.S., Velarde J.M.C., Senhorini J.A. & Veríssimo-Silveira R. (2012) Toxicidade de crioprotetores aos embriões de *Prochilodus lineatus* [Cryoprotectant toxicity in *Prochilodus lineatus* embryos]. Proceedings of Aquaciência, Palmas, Brazil.

Robertson S.M., Lawrence A.L., Neill W.H., Arnold C.R. & McCarthy G. (1988) Toxicity of the cryoprotectants glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, sucrose, and sea salt solutions to the embryos of red drum. *Progressive Fish-Culturist* **50**, 148–154.

Robles V., Cabrita E., Real M., Álvarez R & Herráez M.P. (2003) Vitrification of turbot embryos: preliminary assays. *Cryobiology* **47**, 30–39.

Roubaud P., Chaillou C. & Sjafei D. (1985) Variations cycliques de la tolerance a un thermique froid appliqué au cours de la segmentation de l'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *Canadian Journal of Zoology* **63**, 657–663.

Streit Jr. D.P., Digmayer M., Ribeiro R.P., Sirol R.N., Moraes G.V. & Galo J.M. (2007) Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento [Pacu embryos submitted to different cooling protocols]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 1199–1202.

Val, A. L. & Val-Almeida, V. M. F. (1995) *Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects*. Springer Heidelberg.

Zhang T., Liu X.Z. & Rawson D.M. (2003) Effects of methanol and developmental arrest on chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Theriogenology* **59**, 1545–1556.

Zhang T. & Rawson D.M. (1995) Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology* **32**, 239–246.

Zhang T., Rawson D.M. & Morris G.J. (1993) Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Aquatic Living Resources* **6**, 145–153.

10 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos três capítulos anteriores pode-se concluir que embriões resfriados de *P. brachypomus* e *C. macropomum* apresentam taxa de sobrevivência larval, com desenvolvimento completo satisfatório a temperatura de 2 °C, por até 6 horas de resfriamento. Além disso, foi observado que a solução glicose 0,5M (17,5%) e metanol 10% é a mais indicada para resfriamento de embriões de *P. brachypomus* e *C. macropomum* a temperatura de 2 °C por até 6 h de estocagem. Os estádios embrionários selecionados mais indicados para realizar o resfriamento foram aqueles obtidos em 8 hpf e 13 hpf, correspondentes às fases de epibolia e aparecimento de vesícula óptica.

A solução sacarose-metanol foi a mais eficiente no resfriamento de embriões de *P. brachypomus* nos estádios de 8 hpf e 13 hpf por até 6 h de estocagem a -10 °C, embora tenham sido observadas larvas vivas com desenvolvimento completo em até 12 h de armazenamento nessas fases e nesse tratamento.

11 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para o desenvolvimento da criopreservação e resfriamento de embriões de peixes de água doce pode-se destacar as seguintes ações:

- Avaliar outras soluções crioprotetoras e testar vários níveis de concentração no resfriamento.
- Verificar viabilidade larval em soluções crioprotetoras quando resfriadas à temperaturas negativas e em pelo menos dois tempos de estocagem.
- Analisar injúrias causadas pelas baixas temperaturas com diferentes soluções crioprotetoras.
- Testar protocolos de resfriamento para a possibilidade de preservação de embriões em estádios embrionários contidos nas primeiras horas pós fertilização.
- Realizar experimentos para aprofundar o conhecimento de fatores relacionados a injúrias no resfriamento, controle total da permeabilidade e osmorregulação do embrião.
- Desenvolver um posterior protocolo de congelamento de embriões com a utilização de diluentes e agentes crioprotetores.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology*, v.44, p.114–121, 2002.

AHAMMAD, M.M.; BHATTACHARYYA, D.; JANA, B.B. Hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo stored at 4 and –2°C in different concentration of methanol and sucrose. *Theriogenology*, Stoneham, v.60, n.8, p.1409-1422, 2003.

ANIL, S.; GHAFARI, F.; ZAMPOLLA, T.; RAWSON, D.M.; ZHANG, T. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue fragment *Cryoletters*, Lewes, v. 32, n. 1, p. 40-50, 2011.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Criação de tambaqui. In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C (Org). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005, p.175-202.

BEIRAO, J.; ROBLES, V.; HERRAEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; DINIS, M.T.; CABRITA, E. Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* v.261, p.897–903, 2006.

BILLARD, B.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. London: Taylor and Francis Books, 2001. 46 p. (Cryobanking the Genetic Resources: Wildlife Conservation for the Future?).

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CHEREGUINI, O.; WALLACE, J.C.; HERRÁEZ, M.P.; Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*), *Cryobiology* v.47, p.204–213, 2003a.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; CHEREGUINI, O.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; HERRÁEZ MP. Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology*, Woburn, v. 60, n. 3, p. 463-473, 2003b.

CABRITA, E.; ROBLES, V.; WALLACE, J.C.; SARASQUETE, M.C.; HERRÁEZ, M.P. Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* v.251, p.245–255, 2006.

CALVIN, S.L.; MAISSE, G. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. *Cryobiology* n.36, p.255– 62, 1998.

CARDONA-COSTA, J.; FRANCISCO-SIMÃO, M.; GARCIA-XIMENEZ, F. Can vitrified zebrafish blastomeres be used to obtain germ-line chimaeras? *Cryoletters*, v. 30, n. 6, p. 422-428, June 2009.

CHELLAPA, S.; CHELLAPA, N.T.; BARBOSA, W.T.; HUNTIGORD, F.A.; BEVERIDGE, M.C.M. Growth and production of the Amazonian Tambaqui in fixed cages under different feeding regimes. *Aquaculture International*, v.3, p. 11-21. 1995.

CHEN, S.L.; TIAN, Y.S. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification, *Theriogenology* v.63, p.1207–1219, 2005.

DING, F.H.; XIAO, Z.Z.; LI J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream (*Pagrus major*) embryos, *Theriogenology* v.68, p.702–708, 2007.

EL-BATTAWY, K. A.; LINHART, O. Preliminary studies on cryopreservation of common tench (*Tinca tinca*) embryos: work in progress. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 44, n. 4, p. 718-723, 2009.

FAO, Fishery and Aquaculture Statistics - Aquaculture production. 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 220p.

FAO, Fishery and Aquaculture Statistics - Aquaculture production. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 107p.

FERNANDES, J. B. K.; LOCHMANN, R.; BOCANEGRA, F. A. Apparent digestible energy and nutrient digestibility coefficients of diet ingredients for pacu *Piaractus brachypomus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. v.35, n.2, 2004.

FORNARI, D.C. *Crioconservação de embriões de Tambaqui*. 2012. 77f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Paraná. 2012.

FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L.; MORAES, V.G. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. *Zygote*, Cambridge, v.19, n.2, p.345-350, 2010.

HAGEDORN, M.; KLEINHANS, F.W.; WILDT, D.E.; RALL, W.F. Chill sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology*, San Diego, v.34, n.3, p.251-263, 1997.

HARVEY, B. Banking fish genetic resources: the art of the possible, In: F. DiCatri, T. Younes (Eds.), *Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership*, CAB International, Wallingford, UK, 1996, pp. 439–445.

HERRÁEZ, M. P. Criopreservación de gametas y embriones. In: Carrillo-Estévez, M. A.(Eds.). *La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009, p.477-530.

HIGAKI, S.; MOCHIZUKI K.; BABA H.; AKASHI Y.; YAMAHA E.; KATAGIRI S.; TAKAHASHI Y. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Japanese Journal of Veterinary Research*, Sapporo, v. 57, n. 2, p. 119-128, 2009.

GUAN, M.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification. *Cryoletters*, Lewes, v. 31, n. 3, p. 230-238, 2010.

GOULDING, M. Ecology and management of migratory food fishes of the Amazon Basin. In: ALMEIDA, F.; PRINGLE, C. M. (eds.). Tropical rainforests, diversity and conservation. California Academy of Sciences, San Francisco: p. 71-85, 1988.

GWO, J.C.; STRAWM, K.; ARNOLD, C.R Change in mechanical tolerance and chilling sensitivity of red drum (*Sciaenopus ocellatus*) embryos during development. *Theriogenology*. Stoneham, v.43, n.7, p.1155-1161, 1995.

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. *Panorama da Aqüicultura*. Rio de Janeiro, v.14, n.82, p. 49-55, mar/abr. 2004.

LAHNSTEINER, F. Factors affecting chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos *Theriogenology* v.72, p.333–340, 2009.

LI, L.L.; ZHANG, Q.H.; LIU, X.Z.; XU, Z.Z.; . XIAO, D.Y.; MA, S.H.; XU, Q.Z. Extra- and intra-cellular ice formation of red seabream (*Pagrus major*) embryos at different cooling rates *Cryobiology* v.59, p..48–53, 2009.

LIU, X.H.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* v.55, p.1719-1731, 2001.

LOPES, T.S.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J.R. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.728-735. 2009.

LOPES, T. S.; ROMAGOSA, E.; STREIT JR, D. P.; RIBEIRO, R. P.; DIGMAYER, M. Cooling of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) embryos at various stages of development for 6 or 10 hours *Theriogenology* v.75, p.570–576, 2011.

LOPES, T.S.; STREIT JR, D.P.; FORNARI, D.C.; OLIVEIRA, D.; RIBEIRO, R.P.; RIBEIRO, R.P.; ROMAGOSA, E. Chilling curves for *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) embryos stored at -8°C. *Zygote*, Cambridge, p.1-6. 2012.

MAISSE, G.; LABBE, C.; OGIER DE BAULNY, B.; LEVERONI, S.; HAFFRAY, P. Cryoconservation de sperme et des embryons de poissons. INRA. *Produção Animal*, v.11, n.1, p.57-65, 1998.

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. *Aquatic. Research*, v.42, p.177-187, 2011.

MILONE, Giuseppe. *Estatística geral e aplicada*. São Paulo: Centage Learning, 2009. Capítulo 12.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FRANCISCATTO, R; MARIA, A. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.33, n.6, p.1361-1365, 2004.

MURGAS, L.; MILIORINI, A; FREITAS, R; PEREIRA, J. Criopreservação de sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.36, n.3, p.526-531, 2007.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; SILVEIRA, R.V.; SENHORINI, J.A.; ALEXANDRE, J.S.; CHAGURI, M.P. Fertilidade do sêmen de matrinxã (*Brycon amazonicus*) criopreservado em nitrogênio líquido. *Boletim técnico do CEPTA*, Pirassununga, v. 19, p. 1-8, 2006.

NINHAUS-SILVEIRA, A; SILVA COSTA, R.; VELARDE, J.M.C.; SENHORINI, J.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. Toxicidade de crioprotetores aos embriões de *Prochilodus lineatus*. In: V AQUACIÊNCIA, Palmas, 2012.

RAHMAN, M.; MAJHI, S.K.; SUZUKI, T.; MATSUKAWA, S.; STRÜSSMANN C.A.; TAKAI R. Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. *Cryobiology* v.57, p.170–174, 2008.

RAHMAN, M.; MAJHI, S.K.; SUZUKI, T.; MATSUKAWA, S.; WATANABEA, M. Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the

cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. *Theriogenology* v.75, p.248–255, 2011.

RALL, W.F. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.237-245, 1992.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; DE PAZ, P.; CUÑADO, S.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M.P. Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology* .v.61, p.1367-79, 2004.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; REAL, M.; ÁLVAREZ, R.; HERRÁEZ, M.P. Vitrification of turbot embryos: preliminary assays, *Cryobiology* v.47, p.30–39, 2003. 2005.

SANTOS, G.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. Peixes Comerciais de Manaus –Manaus: Ibama/AM, ProVázea. 144, 2006.

SILAKES, S.; BART, A. N. Ultrasound enhanced permeation of methanol into zebrafish, *Danio rerio*, embryos. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 303, n. 1/4, p. 71-76, 2010.

SILVA, J.W.B.; CAMINHA, M.I.O.; NOBRE, M.I.S.; BARROS-FILHO, F.M. Resultados de um ensaio sobre o cultivo do híbrido do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818, com a pirapitinga *P. brachypomum* CUVIER, 1818, realizado no centro de pesquisa ictiológico “Rodolpho Von Ihering” (Pentecostes, Ceará, Brasil). *Ciência Agrônômica*. Fortaleza, v.17, n.2, p.7- 18, dez. 1986.

SILVA COSTA, R.; VELARDE, J.M.C.; SENHORINI, J.A; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Resfriamento de embriões de peixes neotrópicais. In: V AQUACIÊNCIA, Palmas, 2012.

SOBRINHO, A.; SILVA, A.; MELO, F. Resultados de um experimento de policultivo da pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818), com o híbrido de tilápias (*Oreochromis niloticus*). *Boletim Técnico do DNOCS*, v.42, n.1, p.91-115, 1984.

STREIT JR, D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAIS, V.G.; GALO, J. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, n.42, v.8, p.1199-1202. 2007.

SUFRAMA. Potencialidades Regionais. Estudo de Viabilidade Econômica – Sumário Executivo. Isae/ Fundação Getúlio Vargas (FGF), 2003.

SUQUET, M.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, v.31, p. 231-243. 2000.

THE R PROJECT FOR STATISTICAL COMPUTING, version 2.15. Disponível em:
<[http:// http://www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)>

TOMITA, F. I.; GONÇALVES, L. U.; VIEGAS, E. M. M. Desenvolvimento embrionário do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Maringá: Aquaciência, 2008. 1 CD-ROM.

TSAI, S.; RAWSON, D. M.; ZHANG, T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology*, Woburn, v. 71, n. 8, p. 1266-1233, 2009.

VAL, A. L.; VAL-ALMEIDA, V. M. F. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects. Springer Heidelberg, 1995, 224p.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA J.A.; BORGHETTI, J.R. 2000. Aquicultura no Brasil. Brasília.

VÀLQUEZ-TORRES, W. A pirapitinga: reprodução e cultivo. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFMS, 2005, p.203-224.

VIVEIROS, A.T.M.; GODINHO H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.34, n.2, 2008.

ZHANG X.S., ZHAO L., HUA T.C., ZHU H.Y.,. A study on the cryopreservation of common carp *Cyprinus carpio* embryos. *Cryo Letters*, v.10, p.271-278, 1989.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*, San Diego, v.32, n.3, p.239-246, 1995.

ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C.; LIU, X.Z.; XU, Y.Y.; WANG, C.L.; SAWANT, M.S.; LI, J.; CHEN, S.L. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60, p. 989-996, 2003.

ZHANG, Y.Z.; ZHANG, S.C ; LIU, X.Z.; XU, Y.J.; HU, J.H.; XU, Y.Y.; LI, J.; CHEN, S.L. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*, Stoneham, v.63, n.3, p.763-773, 2004.

ZHANG, T.; RAWSON, D.M.; TOSTI, L.; CARNEVALI, O. Cathepsin activities and membrane integrity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes after freezing to – 196°C using controlled slow cooling. *Cryobiology*, San Diego v.56, n.3, 138–143, 2008.